



ÁREA DE MEDICINA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

**APROXIMACIÓN A LA METÁSTASIS A TRAVÉS
DE LA CÉLULA TUMORAL CIRCULANTE: DESDE EL
NICHOS PREMETASTÁSICO A LA MONITORIZACIÓN
CLÍNICA**

Memoria que presenta

Javier Mariscal Ávila

para optar al grado de Doctor

Fdo. Javier Mariscal Ávila

Santiago de Compostela, 2016



La presente tesis doctoral ha sido financiada parcialmente por el Programa de Ayudas Predoctorales de la Escuela de Doctorado Internacional de la Universidad de Santiago de Compostela.

El Dr. Miguel Abal Posada, investigador estabilizado del Sistema Nacional de Salud, y el Dr. Rafael López López, Jefe del Servicio de Oncología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

CERTIFICAN:

Que la presente tesis doctoral presentada por Javier Mariscal Ávila, que lleva por título: **"Aproximación a la metástasis a través de la Célula Tumoral Circulante: desde el nicho premetastásico a la monitorización clínica"**, ha sido realizada bajo su dirección en el Laboratorio de Oncología Médica Traslacional en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada para optar al grado de Doctor.

Revisada la misma, autorizamos su presentación para ser juzgada como tesis doctoral por el correspondiente tribunal, y para que conste firmamos la presente en Santiago de Compostela a 19 de Septiembre de 2016.

Fdo. Miguel Abal

Fdo. Rafael López



RESUMEN

Aproximación a la metástasis a través de la célula tumoral circulante: desde el nicho premetastásico a la monitorización clínica

El cáncer es una de las enfermedades más devastadoras en la sociedad moderna. Mientras que en sus estadios iniciales el cáncer se presenta como una enfermedad con alternativas clínicas, la detección de masas tumorales diseminadas determina un cambio en el escenario clínico que obliga a un abordaje con escasas alternativas terapéuticas. Biológicamente, la diseminación metastásica se define como la secuencia de eventos mediante el cual la célula tumoral confinada se incorpora al torrente sanguíneo y sobrevive en circulación hasta que es eventualmente retenida en un órgano distante. Una vez retenida, se incorporará al parénquima del tejido huésped y comenzará a proliferar dando lugar así a nuevas masas tumorales. Este proceso dispersivo constituye en su conjunto un evento complejo en el que la metástasis no es meramente un proceso celular invasivo, sino que va acompañado de una gran plasticidad influenciada por el ambiente tumoral. Este ambiente conforma a su vez una activa red de comunicación que favorece en última instancia la progresión de las lesiones metastásicas.

El trabajo aquí desarrollado tiene como objetivo profundizar en el conocimiento del modo en el que se desarrolla la diseminación metastásica a partir de dos de sus participantes. La Célula Tumoral Circulante como unidad biológica responsable de la formación de nuevas masas tumorales; y el exosoma tumoral como vesícula de comunicación entre la célula, su entorno y partícipe del acondicionamiento del nicho pre-metastásico.

La detección y elaboración de un perfil de expresión específico de CTCs de cáncer de pulmón de célula no-pequeña (NSCLC) nos ha permitido identificar un perfil transcripcional orientado a la supervivencia, proliferación y movilidad celular a la vez que identifica NOTCH1 como partícipe de las características de esta subpoblación celular. En esta dirección, NOTCH1 ha sido asociado con anterioridad a progresión tumoral en NSCLC vinculado a un entorno de transición Epitelio-Mesénquima (EMT). Asimismo, los datos obtenidos proporcionan una

serie de biomarcadores derivados de CTCs con valor clínico para Supervivencia libre de progresión y Supervivencia global. En este sentido, la ruta de Notch representa una diana terapéutica de gran interés y cuya inhibición está siendo evaluada en distintos ensayos clínicos.

Considerando la influencia del proceso de EMT en la plasticidad de la célula tumoral, hemos desarrollado un análisis proteico por SILAC del proteoma, secretoma soluble y exosoma de la línea de cáncer de endometrio HEC-1A dentro de un marco de EMT. Este modelo nos ha permitido establecer diferencias en la fracción secretada -secretoma soluble y exosoma- derivadas de un cambio en el programa transcripcional de la célula tumoral y determinar su influencia en el anidamiento de la célula tumoral. Estos análisis identifican un proteoma y secretoma orientado a la supervivencia celular como consecuencia del proceso de EMT determinado por la sobreexpresión de ETV5. Asimismo, identificamos la presencia de distintos componentes de matriz extracelular dentro del cargo exosomal de HEC-1A, lo que, a la vista de nuestros resultados, favorece el anidamiento de la célula tumoral en circulación al tejido endotelial.

Los resultados obtenidos participan de la hipótesis de *Seed & Soil* propuesta por S. Payet en 1889 a la vez que entran en consonancia con investigaciones más recientes que destacan el papel de los exosomas en el acondicionamiento del nicho pre-metastásico. De acuerdo a este modelo, el anidamiento de la CTC, con características pseudo-mesenquimales, se serviría del pre-acondicionamiento del tejido endotelial derivado del exosoma procedente del tumor primario, el cual está compuesto mayoritariamente por células tumorales de características epiteliales.





TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN

Capítulo 1. La metástasis

1.1. Epidemiología de la metástasis: cáncer de pulmón y cáncer de endometrio.....21

1.2. La colonización metastásica.....25

1.2.1. La Célula Tumoral Circulante

1.2.2. Intravasación de la CTC

1.2.3. Circulación hematógena

1.2.4. Extravasación de la CTC

1.2.4.1. Arresto

1.2.4.2. Translocación endotelial

1.2.5. Formación de micro-metástasis

1.2.6. EMT asociada a la Célula Tumoral Circulante

1.2.6.1. ETV5 como promotor de EMT

1.3. El nicho pre-metastásico.....33

1.3.1. La hipótesis de "Seed & soil"

1.4. El exosoma y la diseminación metastásica.....35

1.4.1. El exosoma y el nicho pre-metastásico

1.4.2. El exosoma y la Célula Tumoral Diseminada

Capítulo 2. La biopsia líquida

2.1. Utilidad clínica de la biopsia líquida.....40

2.2. Biomarcadores en circulación.....41

2.2.1. DNA tumoral circulante

2.2.2. La Célula Tumoral Circulante

2.2.2.1. CTC vs. ctDNA

2.2.3. microRNAs

2.2.4. Vesículas extracelulares y exosomas

Capítulo 3. Hipótesis y objetivos.....55

MATERIALES Y MÉTODOS

Capítulo 4. Caracterización de CTCs en NSCLC y determinación de su valor clínico

4.1. Inmunocaptura y detección de CTCs.....61

4.1.1. Selección de pacientes

4.1.2. Enriquecimiento de CTCs y extracción de RNA total

4.1.3. Retrotranscripción

4.1.4. Pre-amplificación y RT-qPCR

4.2. Perfil de expresión de CTCs EpCAM⁺.....65

4.2.1. Amplificación del transcriptoma y *Gene Expression Microarray*

4.2.2. Análisis de significación

4.2.3. Interpretación biológica de los datos

4.3. Validación y contraste con variables clínicas....67

4.3.1. Selección y validación de genes candidato

4.3.2. Contraste con variables clínicas

4.4. Inhibición de Notch *in vitro*.....68

4.4.1. Cultivo celular: cáncer de pulmón

4.4.2. Proliferación en ausencia de sustrato

Capítulo 5. Caracterización del proteoma y fracción secretada de HEC-1A y H-ETV5

5.1. Obtención de exosomas de HEC-1A y H-ETV5...69

5.1.1. Cultivo celular: cáncer de endometrio

5.1.2. Purificación de exosomas de medios condicionados

5.2. Caracterización de exosomas.....70

5.2.1. Montaje de exosomas completos para microscopía electrónica TEM

5.2.2. Marcadores de exosomas

5.2.3. Perfil de tamaño de exosomas

5.3. Caracterización proteica por SILAC del proteoma, secretoma y exosoma de HEC-1A y H-ETV5.....73

5.3.1. SILAC: *Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture*

5.3.2. Puesta a punto de las condiciones para SILAC

5.3.2.1. Acondicionamiento del cultivo

5.3.2.2. Determinación de la concentración de L-Lys y L-Arg

5.3.2.3. Marcaje

5.3.3. Procesamiento de las muestras para SILAC

5.3.3.1. Muestras de proteoma

5.3.3.2. Muestras de exosoma

5.3.3.3. Muestras de secretoma soluble

5.3.4. Análisis de las muestras

5.3.4.1. Tinción con nitrato de plata

5.3.4.2. Análisis de función para SILAC

Capítulo 6. Impacto del exosoma tumoral en el anidamiento de la Célula Tumoral Circulante

6.1. Obtención de células endoteliales.....82

6.1.1. Cultivo celular: células endoteliales

6.1.2. Cultivo celular: células primarias de vena umbilical (HUVEC)

6.2. Depleción de exosomas del suero.....83

6.3. El exosoma en el anidamiento tumoral.....84

6.3.1. Adhesión a una superficie funcionalizada con exosomas

6.3.2. Adhesión a matriz extracelular

6.3.3. Adhesión a monocapas endoteliales

6.3.4. Activación del endotelio con exosomas tumorales

6.3.4.1. Extracción de RNA total de cultivo celular

6.3.4.2. Determinación del rendimiento de RNA total

6.3.4.3. Retrotranscripción

6.3.4.4. RT-qPCR

6.3.5. Expresión de proteína

6.3.5.1. Extracción de proteína total

6.3.5.2. Cuantificación de proteína total

6.3.5.3. Western blot

6.3.6. Análisis estadísticos

6.4. Materiales suplementarios.....89

RESULTADOS

Capítulo 7. El perfil molecular de las CTCs identifica NOTCH1 como un regulador principal en NSCLC

7.1. Caracterización de CTCs en NSCLC avanzado....93

7.1.1. Inmunoaislamiento de CTCs

7.1.2. Determinación del perfil de expresión génica para CTCs en NSCLC

7.1.3. Biología de las CTCs EpCAM⁺

7.1.4. Validación del *microarray* de expresión génica por RT-qPCR

7.2. La inhibición de Notch previene la proliferación en ausencia de sustrato.....100

7.3. Valor pronóstico de los biomarcadores validados.....100

Capítulo 8. Caracterización del exosoma de HEC-1A y H-ETV5 e influencia en el anidamiento tumoral a endotelio

8.1. Obtención de exosomas de cáncer de endometrio.....105

8.2. La sobreexpresión de ETV5 desencadena un proceso de EMT en HEC-1A.....109

8.3. Rendimiento de exosomas.....110

8.4. Caracterización proteómica de HEC-1A y H-ETV5: SILAC.....111

8.4.1. Fase de adaptación

8.4.2. Fase experimental

8.4.3. Análisis de las muestras de proteoma, secretoma y exosoma

8.4.3.1. Proteínas moduladas para el proteoma

8.4.3.2. Proteínas moduladas para el secretoma

8.4.3.3. Proteínas moduladas para el exosoma

8.5. Influencia del exosoma en el anidamiento tumoral.....120

8.5.1. Adhesión de las células tumorales a exosomas

8.5.2. Adhesión de la célula tumoral a matriz extracelular

8.5.3. Adhesión de las células tumorales a endotelio condicionado por exosomas

8.5.4. Exosomas de HEC-1A estimulan la activación endotelial

8.6. Tablas suplementarias.....123

Capítulo 9. Discusión.....133

Capítulo 10. Conclusiones.....151

ANEXO. Escenario clínico del cáncer de pulmón y cáncer de endometrio

Capítulo 11. El carcinoma de pulmón

11.1. El pulmón: estructura y función.....	155
11.2. Factores de riesgo del CP.....	156
11.3. Prevención y <i>screening</i> del CP.....	156
11.4. Sintomatología del CP.....	157
11.5. Diagnóstico del CP.....	157
11.6. Clasificación del CP.....	158
11.6.1. Clasificación histopatológica	
11.6.1.1. <i>Lesiones pre-invasivas</i>	
11.6.1.2. <i>Cáncer de pulmón de célula no-pequeña (NSCLC)</i>	
11.6.1.3. <i>Cáncer de pulmón de célula pequeña (SCLC)</i>	
11.6.1.4. <i>Otras lesiones invasivas</i>	
11.6.2. Clasificación clínico-patológica: Estadificación TNM	
11.6.3. Clasificación según el Estado Funcional	
11.7. Patología molecular del CP.....	163
11.7.1. Bases moleculares del NSCLC	
11.7.2. Bases moleculares del SCLC	
11.8. Tratamiento del CP.....	166
11.8.1. Cirugía	
11.8.2. Radioterapia	
11.8.3. Quimioterapia	

11.8.4. Terapia dirigida

11.8.4.1. Terapia dirigida contra ALK

11.8.4.2. Terapia dirigida contra EGFR

11.8.4.3. Terapia dirigida contra ROS1

11.8.4.4. Otras terapias dirigidas en desarrollo

11.8.5. Inmunoterapia

11.9. Factores pronóstico y predictivos en CP.....170

11.9.1. Factores clínico-patológicos

11.9.2. Biomarcadores

Capítulo 12. El carcinoma de endometrio

12.1. El útero: estructura y función.....173

12.2. Factores de riesgo del CE..... 174

12.3. Prevención y *screening* del CE.....175

12.4. Sintomatología del CE.....176

12.5. Diagnóstico del CE.....176

12.6. Clasificación del CE.....176

12.6.1. Clasificación histopatológica

12.6.1.1. Lesiones pre-invasivas

12.6.1.2. Adenocarcinoma endometrioide

12.6.1.3. Adenocarcinoma no-endometrioide

12.6.2. Clasificación clínico-patológica

12.6.3. Clasificación según el grado de invasión tumoral:

Estadificación F.I.G.O.

12.7. Patología molecular del CE.....181

12.7.1. Cáncer de endometrio de tipo I

12.7.2. Cáncer de endometrio de tipo II

12.8. Tratamiento del CE.....184

12.8.1. Terapia adyuvante

12.8.1.1. Radioterapia

12.8.1.2. Quimioterapia

12.8.1.3. Terapia hormonal

12.8.1.4. Terapias dirigidas

12.9. Factores pronóstico y predictivos en CE.....186

12.9.1. Factores clínico-patológicos

12.9.2. Biomarcadores

REFERENCIAS.....191

LISTA DE FIGURAS.....213

LISTA DE TABLAS.....216

LISTA DE ABREVIATURAS.....221

AGRADECIMIENTOS.....227



INTRODUCCIÓN





Capítulo 1. La metástasis

1.1. Epidemiología de la metástasis: cáncer de pulmón y cáncer de endometrio

El cáncer es un problema de salud pública global y una de las enfermedades que mayor impacto tienen a nivel clínico y social. El proceso oncológico avanzado constituye además una enfermedad sistémica cuya influencia se extiende más allá del tumor primario, siendo la diseminación tumoral y la aparición de metástasis la causa principal de muerte en oncología¹. Actualmente se han identificado más de cien tipos tumorales distintos centrándose este trabajo en el cáncer de pulmón y cáncer de endometrio como modelos de trabajo.

El cáncer de pulmón (CP) se caracteriza por una incidencia especialmente significativa siendo el cáncer con mayor número de muertes asociadas¹. Además, el CP presenta un abordaje clínico complejo en el que la detección de la enfermedad es tardía y más del 60% de los diagnósticos presentan enfermedad diseminada; lo cual lastra severamente la supervivencia del paciente (Figura 1)¹. Por su parte, el cáncer de útero representa el cuarto cáncer más frecuente en mujeres y el primero de origen ginecológico¹. El 75% de los diagnósticos ocurren en mujeres post-menopáusicas siendo más del 80% diagnosticadas cuando la enfermedad está aún localizada. Esto hace del cáncer de útero un cáncer de buen pronóstico con una supervivencia a 5 años del 76%, pero en el que aquella fracción de pacientes con núcleos metastásicos distantes al diagnóstico la supervivencia a 5 años alcanza únicamente el 15% (Figura 1).

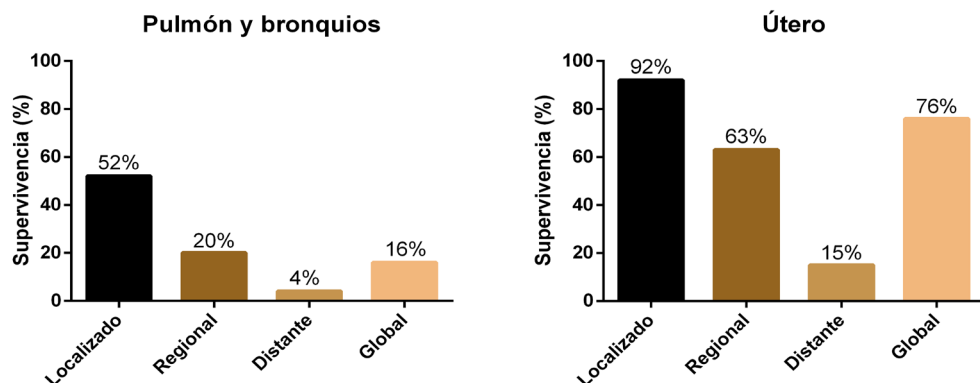


Figura 1. Tasa de supervivencia a 5 años en cáncer de pulmón y cáncer de útero en función del grado de diseminación tumoral (EEUU 2005-2011). Adaptado de Siegel *et al*¹.

Esta disparidad en el pronóstico clínico está sustentada por un cambio en el escenario en el que se desarrolla la enfermedad. Mientras estadios iniciales permiten alternativas relativamente eficaces dentro de un marco local, estadios avanzados obligan a un abordaje global caracterizado a menudo por su baja eficiencia e inespecificidad.

En cáncer de pulmón de células no-pequeñas (NSCLC; *Non-Small Cell Lung Cancer*) -el cual representa el 85% de los casos totales-, estadios I, II y III son a menudo tratados quirúrgicamente pudiendo incluir radioterapia y/o quimioterapia en adyuvancia o neoadyuvancia². En cambio, estadios más avanzados a menudo presentarán núcleos diseminados que imposibilitan un abordaje quirúrgico. En estos casos es frecuente el uso de distintos regímenes de quimioterapia que vendrán determinados por la extensión tumoral y el estado del paciente².

Eventualmente, es posible también un abordaje local en el caso de tumores confinados a los pulmones o que se han propagado puntualmente. Tumores de estas características en ocasiones refieren metástasis cerebrales únicas que pueden ser tratadas con cirugía y/o radioterapia (generalmente radiocirugía estereotáctica seguida de WBRT; *Whole Brain Radiotherapy*) al margen del tratamiento de las lesiones pulmonares³. En el caso de propagación puntual a otros órganos -como glándulas adrenales, hueso o hígado- es posible también el uso de radioterapia local en sus distintas variantes².

En cánceres de pulmón ampliamente propagados se procederá sin embargo a una evaluación histológica de las lesiones y la búsqueda de marcadores genéticos que orienten la decisión clínica. La detección de alteraciones genéticas en *EGFR*, *ALK* o *ROS1* permiten actualmente el uso de estrategias dirigidas. En el caso de cánceres sin características moleculares que permitan el uso de terapias dirigidas la quimioterapia abarcará las principales opciones de tratamiento. Estos regímenes suelen incluir la combinación de dos compuestos quimioterápicos -a menudo incluyendo derivados del platino y/o taxoles- aunque es posible la administración de un solo compuesto o incluso radioterapia en situaciones en las que el estado físico del paciente lo recomiende. La progresión de la enfermedad, durante o después del tratamiento, implicará generalmente la utilización de una nueva combinación de quimioterápicos en segunda o tercera línea. Ocasionalmente, es posible también la administración de la terapia en ausencia de progresión clínica como medida de control de la enfermedad en la denominada terapia de mantenimiento².

En cáncer de endometrio (CE), al contrario que ocurre en cáncer de pulmón, la mayoría de los casos son diagnosticados en estadios tempranos por lo que la opción quirúrgica recoge la mayoría de los tratamientos con una finalidad curativa. El tratamiento de la enfermedad metastásica o recurrente -la tasa de recurrencia es del 15% alcanzando hasta el 50% en pacientes con estadios avanzados o histologías agresivas- incluye principalmente recurrencias pélvicas aisladas o con un sólo núcleo metastásico⁴; y en el que el tratamiento suele incluir un abordaje local mediante cirugía o radioterapia alcanzándose una supervivencia a 5 años que oscila entre el 20-40%⁴. En este sentido, la radioterapia en pacientes de riesgo ha demostrado beneficio clínico realizándose preferentemente mediante la exposición directa de las células tumorales a través de la vagina (braquiterapia vaginal) frente a la terapia de radiación externa.

En el caso de diseminación peritoneal el manejo de la enfermedad se orientará también hacia una cirugía citorreductora o terapia local reservándose el tratamiento con quimioterápicos en pacientes no operables⁵. Actualmente la combinación de carboplatino-paclitaxel representa la aproximación quimioterápica más frecuente en este grupo de pacientes⁴. Asimismo, el tratamiento con

tamoxifeno y derivados de la progesterona ha demostrado una respuesta de en torno al 30% en estadios avanzados arrojando a su vez tasas de respuesta variables (10-50%) en pacientes recurrentes o metastásicos⁴.

Histológicamente, podemos identificar también determinadas características vinculadas a la enfermedad diseminada en cáncer de pulmón y cáncer de endometrio. En un estudio realizado por Riihimaki *et al.* en más de 6.000 cánceres de pulmón avanzado se identificó una proporción desigual de pacientes metastásicos en función de la histología⁶. Más del 60% de los casos de adenocarcinomas y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC; *Small Cell Lung Cancer*) presentaron metástasis mientras que el carcinoma de células escamosas (SCC, *Squamous Cell Carcinoma*) detectó metástasis únicamente en el 41% de los pacientes. SCLC presentó además preferencia a la diseminación en hígado y cerebro frente a los adenocarcinomas que metastatizaron también con frecuencia en hueso y pulmón⁶. Por otro lado, el cáncer de endometrio de tipo II -o no endometriode- representa menos del 10-15% del total de casos diagnosticados, pero que sin embargo, representa el 40% de las muertes en cáncer de endometrio. Estos tumores presentan un alto grado histológico con propensión a la diseminación por lo que constituirán los estadios más avanzados y con peor pronóstico, siendo a su vez nódulos linfáticos, vagina, peritoneo y pulmón los tejidos de diseminación más frecuentes⁴.

En este escenario, el estadio de la enfermedad y la presencia, número y localización de los focos metastásicos representan variables clínicas vinculadas al desarrollo tumoral con gran poder pronóstico en CP⁷. Asimismo, el grado de invasión y el tipo histológico presentan un potente valor pronóstico en CE⁸.

Todas estas observaciones ponen de relieve la influencia de la enfermedad metastásica en el proceso tumoral a la vez que señalan la necesidad de un abordaje orientado hacia la misma. En este sentido, una breve revisión de la situación y manejo clínico del cáncer de pulmón -centrado en NSCLC- y del cáncer de endometrio puede ser consultada en el anexo incluido al final del documento (Anexo, página 153).

1.2. La colonización metastásica

El proceso de metástasis se compone de una sucesión compleja de distintas etapas: 1) invasión local e intravasación en vasos sanguíneos y linfáticos. 2) tránsito en circulación y evasión del sistema inmune 3) extravasación en el parénquima de órganos distantes. 4) colonización y formación de micro-metástasis para finalmente su (5) progresión a macro-metástasis. Estas etapas vienen determinadas no sólo por las propiedades de la célula tumoral sino también por el microambiente local que proporciona las condiciones necesarias para la supervivencia y proliferación tumoral -el nicho metastásico-. Este microambiente pivota a su vez sobre una intensa comunicación entre las células tumorales y el tejido huésped llegándose a establecer antes incluso de la llegada de la propia célula tumoral diseminada -el denominado nicho pre-metastásico⁹. A día de hoy, aunque la existencia biológica del nicho pre-metastásico está ampliamente aceptada, queda por elucidar su influencia a la hora de determinar la progresión metastásica^{10,11}.

1.2.1. La Célula Tumoral Circulante

La Célula Tumoral Circulante (CTC) se define como aquella célula tumoral desprendida del tumor primario o metastásico e incorporada a la circulación vía sanguínea o linfática. Estas células constituyen una subpoblación tumoral con unas características moleculares que permiten su supervivencia dentro del ambiente hostil que constituye el torrente circulatorio; siendo algunas de las cuales capaces de abandonar la circulación y proliferar en localizaciones distantes. Biológicamente, la CTC constituye un pronunciado cuello de botella en el proceso de diseminación tumoral y en el que las CTCs representan un porcentaje muy bajo respecto al total de células tumorales, debiendo además superar una serie de etapas caracterizadas por su baja eficiencia¹².

Dado los objetivos de este trabajo haremos una pequeña revisión orientada a la diseminación hematógena existiendo a su vez excelentes trabajos orientados a la diseminación vía linfática¹³. Las distintas etapas que conforman la cascada de diseminación metastásica y la participación de la CTC dentro de la misma se detallan a continuación (Figura 2):

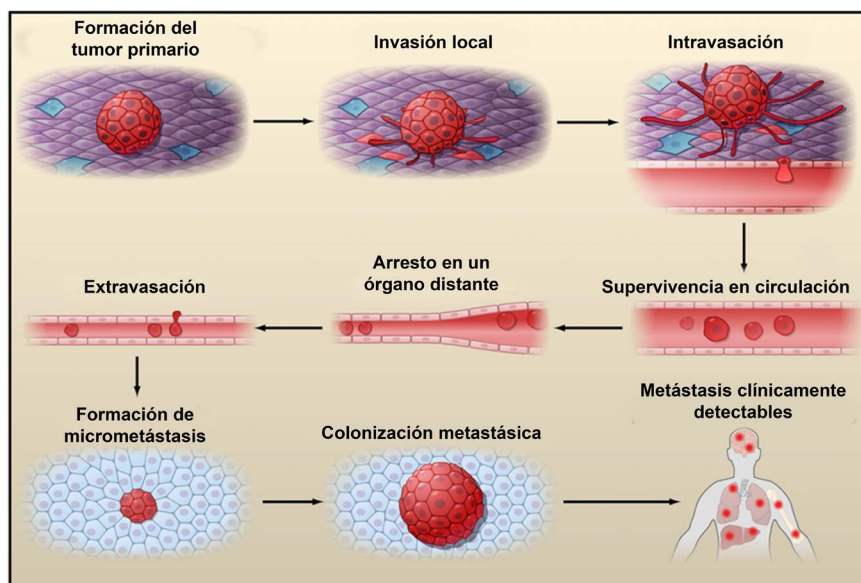


Figura 2. La cascada de diseminación metastásica. Durante la progresión metastásica las células tumorales abandonan el tumor primario (invasión local e intravasación) para su incorporación al torrente sanguíneo (diseminación y supervivencia hematógica) y colonización del tejido distante (arresto y translocación endotelial) para dar lugar a nuevas lesiones tumorales. Adaptado de Valastyan *et al*¹².

1.2.2. Intravasación de la CTC

Para diseminar la CTC debe primeramente desprenderse del núcleo tumoral principal e intravasarse a los vasos sanguíneos. Esta etapa viene influenciada por múltiples factores, estando algunos favorecidos por el propio nicho tumoral.

La matriz extracelular (MEC) y membrana basal próximas al tumor se encuentran a menudo desestructuradas como consecuencia de la expresión de metaloproteasas de matriz (MMPs) y factores asociados al microambiente tumoral^{15,16}. Además, los vasos sanguíneos originados bajo este ambiente suelen presentar una morfología tortuosa y en continua remodelación que facilita la intravasación de la célula tumoral¹⁶. Adicionalmente, salvo en los casos en los que el tumor se encuentra particularmente desagregado¹⁷, es necesaria la participación activa de la CTC en el proceso de intravasación. Esta participación es favorecida por una inestabilidad genética que promueve la aparición de propiedades migratorias e invasivas encontrándose implicados con frecuencia promotores de EMT (Transición Epitelio-Mesénquima)¹⁸. Esta migración está

a su vez favorecida por quimio-gradientes de EGF (*Endothelial Growth Factor*) o TGF β (*Transforming Growth Factor*) en el que participan activamente macrófagos reclutados dentro del ambiente tumoral (TAMs; *Tumor Associated Macrophages*)¹². Finalmente, se ha observado también cómo algunas CTCs son capaces de alcanzar la circulación en forma de agregados celulares favoreciendo su supervivencia, arresto capilar y proliferación¹⁹.

1.2.3. Circulación hematológica

Una vez incorporada la célula tumoral a la circulación esta debe ser capaz de sobrevivir en ausencia de sustrato a un ambiente hostil, sometido a un intenso seguimiento inmune y a fuertes fuerzas hemodinámicas. En condiciones fisiológicas, la ausencia de sustrato representa un fuerte estímulo para la muerte celular programada -referida como anoikis- por lo que estas células deben ser capaces de desarrollar mecanismos para ignorar este estímulo. Asimismo, un arresto temprano favorecerá la evasión de este estímulo pro-apoptótico^{20,21}.

En esta situación se ha observado cómo la CTC es incluso capaz de subvertir procesos fisiológicos con el fin de promover su supervivencia. Algunas CTCs son capaces de promover la formación de agregados plaquetarios en torno a sí participando en el enmascaramiento tumoral de la actividad inmune del huésped^{22,23} y la amortiguación del estrés hemodinámico²⁴. Además, se ha reportado la formación de micro-émbolos mediados por la expresión del factor tisular en la superficie de la célula tumoral favoreciendo así la activación y agregación plaquetaria²⁵. La influencia de estos agregados es tal que aquellos pacientes con enfermedad diseminada presentan un riesgo de procesos trombóticos 7 veces superior frente a pacientes no oncológicos²⁶.

Paralelamente, la expresión de distintas moléculas implicadas en la modulación del seguimiento inmune participan también en la supervivencia de la CTCs en circulación. Son varios los estudios que han reportado la expresión de PD-L1 (*Programmed Cell Death Ligand 1*) en CTCs participando en un descenso del seguimiento de las células T²⁷; o incluso la expresión de marcadores plaquetarios permitiendo a las células tumorales la adquisición de un fenotipo pseudo-plaquetario²⁸.

1.2.4. Extravasación de la CTC

1.2.4.1. Arresto

El tiempo que pasan en circulación las CTCs es muy variable siendo en ocasiones de unos pocos segundos²⁹. Este arresto viene determinado fundamentalmente por dos factores: la retención física de la célula tumoral en los capilares sanguíneos, y un órgano-tropismo mediado por moléculas de adhesión.

Los capilares sanguíneos poseen un tamaño medio de 8 μm mientras que el tamaño de la CTCs ronda los 20-30 μm . Esto hace que sean numerosas las CTCs que quedan retenidas en la primera red capilar que atraviesan -a menudo la red capilar pulmonar o hepática- resultando de este modo tejidos de anidamiento frecuente³⁰. Eventualmente, se ha reportado también la pérdida de citoplasma por parte de la CTCs incrementando su capacidad de diseminación³⁰.

Por último, la adhesión de la CTC a proteínas de membrana tiene lugar por interacción de integrinas tumorales y la MEC -siendo determinados subtipos tumorales capaces de interaccionar directamente con elementos de la membrana basal^{12,29}-. Se ha reportado una mayor probabilidad de diseminación en aquellos tejidos donde esté presente el ligando para un receptor tumoral habiendo conseguido determinar por ejemplo como el eje ligando-receptor CXCR4-SDF1 favorece el anidamiento de las CTCs en cáncer de mama³¹. Adicionalmente, se ha observado también como aquellas CTCs contenidas en micro-émbolos pueden servirse de receptores plaquetarios para su anidamiento²⁴.

1.2.4.2. Translocación endotelial

La translocación endotelial se define como la migración de la CTC a través del endotelio. Inicialmente puede considerarse un proceso opuesto al proceso de intravasación, sin embargo, al contrario que en la intravasación, el tejido receptor de la CTC conserva gran parte de su estructura y funcionalidad. Es por ello que el proceso de extravasación ocurre de manera más forzada y donde gradientes, factores solubles y moléculas de adhesión procedentes del pre-acondicionamiento tumoral y el reclutamiento de precursores pro-tumorales cobra gran importancia a la hora de determinar la eficiencia del proceso¹².

1.2.5. Formación de micro-metástasis

El término micro-metástasis se refiere a aquellas lesiones metastásicas que son demasiado pequeñas para ser clínicamente detectables. Una vez que la célula tumoral extravasa y llega a un nuevo nicho se produce generalmente un periodo de dormancia caracterizado por un equilibrio entre la proliferación y la muerte celular. La duración de este periodo es muy variable pudiendo llegar a durar décadas³². En este periodo la Célula Tumoral Diseminada (CTD) debe adoptar de nuevo un perfil proliferativo salvaguardando la acción de genes supresores de metástasis implicados en la regulación de la división celular, angiogénesis e invasión local²¹. Adicionalmente se ha observado la recuperación de algunas de las funciones "pre-diseminación" adoptando la célula tumoral un programa transcripcional denominado MET (Transición Mesénquima-Epitelio) caracterizado por la reversión de algunas de las características de movilidad e invasión derivadas de EMT³³.

En este nicho metastásico la CTD estará sometida a un nuevo microambiente que, si bien a menudo ha sido preacondicionado, no es exactamente igual al nicho tumoral del que procede. En este marco, la CTD requiere de nuevas interacciones tumorales con el entorno habiéndose observado por ejemplo cómo la producción de IL-11 por células tumorales puede iniciar la osteolisis y alteración de la MEC en metástasis óseas pero es incapaz de estimular esta respuesta en lesiones pulmonares o cerebrales^{12,34}.

Eventualmente, y tras la supervivencia a esta sucesión de eventos, algunas de las CTDs adquirirán de nuevo un cariz proliferativo sustentado por el nicho metastásico. En este sentido, se estima que el 80% de las CTDs son capaces de sobrevivir a la extravasación pero sólo un 3% se convierten en micro-metástasis y menos del 0,02% progresan a lesiones macroscópicas¹².

1.2.6. EMT asociada a la Célula Tumoral Circulante

En procesos neoplásicos es frecuente la aparición de subgrupos celulares que adoptan un programa transcripcional inductor de EMT mediante el cual la célula epitelial disminuye la expresión de marcadores epiteliales e incrementa la expresión de marcadores mesenquimales y de célula madre. La expresión de estos genes participa a su vez en la plasticidad y diseminación tumoral favoreciendo la auto-renovación de la célula tumoral, la invasión del estroma local y la extra- / intravasación³⁵.

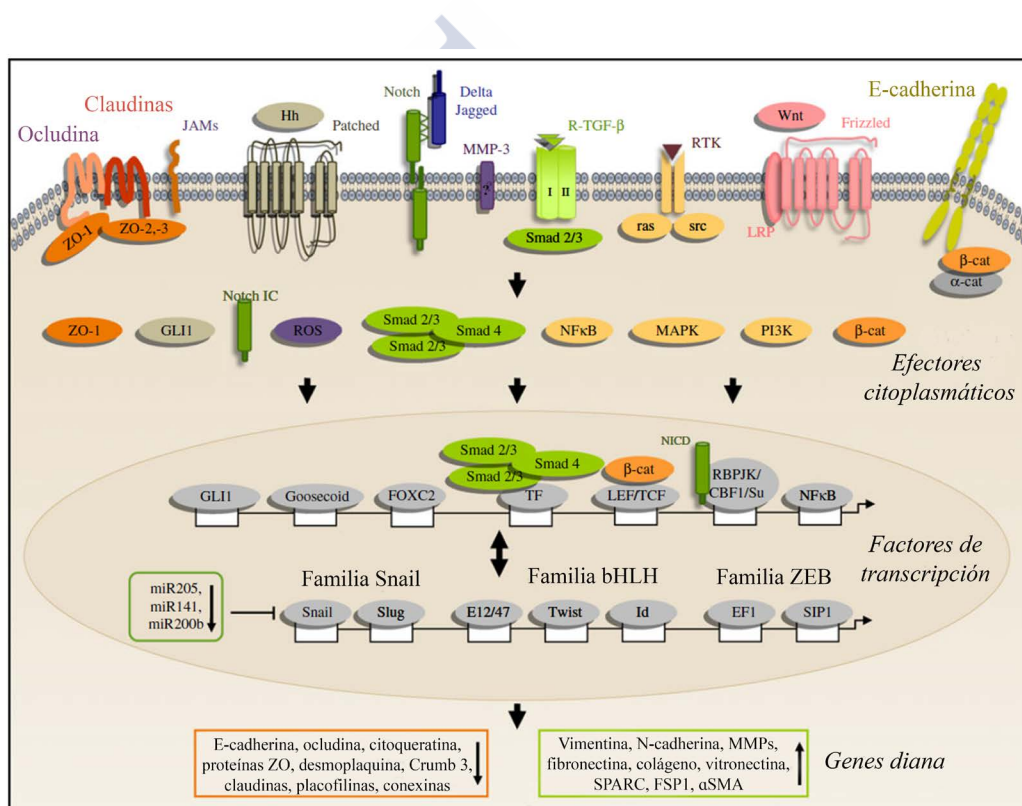


Figura 3. Principales rutas de señalización vinculadas al programa de EMT. La estimulación de estas vías de EMT resulta en la activación de distintos efectores citoplasmáticos (MAPK, PI3K, NK-kB, Smads, β-catenina, ROS o Notch). Estas vías convergen a su vez en una serie de factores de transcripción y co-activadores capaces de regular la expresión de distintos genes diana. La expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina, ocludina o distintas citoqueratinas es regulada negativamente mientras se induce un incremento en la expresión de marcadores mesenquimales como vimentina, N-cadherina y miembros de la familia de las MMPs. Adaptado de Bonnomet *et al*³⁶.

Actualmente existen una serie de genes de diferenciación vinculados a EMT bien caracterizados y que interaccionan con otros programas celulares no estrictamente implicados en el proceso de diferenciación pero que participan en la movilidad e invasividad de la célula tumoral³⁶ (Figura 3). Se ha reportado cómo distintos factores transcripcionales de EMT participan en la extravasación tumoral favoreciendo la interacción de la célula tumoral al tejido endotelial y la migración trans-endotelial³⁷. Asimismo, distintos estudios han demostrado la participación de algunos de estos factores en la supervivencia de la CTC y la adquisición de resistencia frente a diversos agentes antitumorales^{36,38}. Finalmente, se ha observado cómo las metástasis a menudo presentan un grado de diferenciación igual o incluso superior al tumor del que proceden abogando así por un proceso de rediferenciación en la célula tumoral diseminada³³. En este marco, son distintos los estudios que han destacado la influencia de distintos miRNAs en la regulación de distintos genes vinculados a EMT³⁹.

La confluencia de todos estos procesos resultará en un entorno extraordinariamente complejo y dinámico incluido dentro de una heterogeneidad tumoral en la que convivirán CTCs procedentes de distintos progenitores mesenquimales, la adquisición de nuevas mutaciones, un ambiente dinámico y una expresión variable de los distintos marcadores^{40,41}.

1.2.6.1. *ETV5 como promotor de EMT*

El factor de transcripción ETV5 (*Ets variant 5*) es uno de los miembros de la familia de factores de transcripción ETS (*E26 Transformation Specific*) caracterizada por la presencia de un dominio ETS de unión a DNA altamente conservado. Actualmente se conocen 28 miembros clasificados en 12 subgrupos distintos participando en la regulación transcripcional. ETV5, junto con ETV1 y ETV4, pertenece al subgrupo PEA3 (*Polyomavirus Enhancer Activator 3*) definido por la presencia de un dominio ácido en sus extremos N- y C-terminal⁴².

Funcionalmente, los miembros de la familia PEA3 se expresan en numerosos órganos durante el desarrollo embrionario y en adultos; siendo ETV5 el que desempeña una función más ubicua. Entre las funciones identificadas destacan procesos de morfogénesis y diferenciación epitelial con una participación

destacada de ETV4 y ETV5 en el desarrollo mamario y renal; algo que destacan también los modelos animales *knock-out*⁴³. Dichos modelos han reportado también una importante función del eje ETV4 / ETV5 en el desarrollo de los órganos genitales⁴⁴. ETV1 parece, sin embargo, participar fundamentalmente en desarrollo del sistema motor⁴².

En este escenario, se ha observado cómo la sobreexpresión de ETV5 correlaciona con la sobreexpresión de la oncoproteína ErbB2 en cáncer de mama⁴². Además, son distintos los estudios que han vinculado la sobreexpresión de ETV5 con un pronóstico desfavorable^{45,46}, llegándose incluso a establecer una correlación entre el grado de invasión miometrial y los niveles de ETV5⁴⁷. A raíz de estas observaciones, la sobreexpresión de ETV5 ha demostrado promover un proceso de EMT mediado por la activación de miembros de la familia de factores de transcripción ZEB y la represión de E-cadherina; favoreciendo así la remodelación de contactos célula-célula y célula-sustrato y otorgando un fenotipo migratorio e invasivo (Figura 4)⁴⁸. Coherentemente, modelos *in vivo* han demostrado una mayor capacidad de diseminación e invasión en distintas líneas celulares de cáncer de endometrio portadoras de la sobreexpresión de ETV5⁴⁹.

En este trabajo, la sobreexpresión de ETV5 en células inmortalizadas de carcinoma endometrial (HEC-1A; *Human Endometrial Cancer 1A*) nos servirá como modelo de trabajo para la determinación de la influencia del contenido exosomal en el anidamiento metastásico dentro en un marco de EMT.

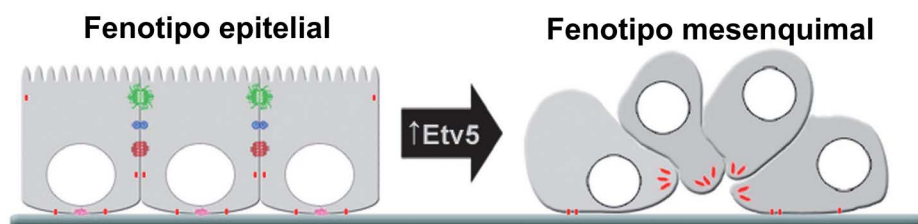


Figura 4. La sobreexpresión de ETV5 en HEC-1A desencadena un proceso de EMT. Células epiteliales mantienen la polaridad celular y contactos célula-célula. La sobreexpresión de ETV5 favorece un fenotipo celular móvil y altamente invasivo. Adaptado de Colás *et al*⁴⁸.

1.3. El nicho pre-metastásico

1.3.1. La hipótesis de "*Seed & soil*"

La diseminación metastásica no ocurre de manera azarosa sino que existen una serie de factores que participan en su destino. Esta observación fue inicialmente establecida por el cirujano inglés Stephen Paget en 1889⁵⁰, el cual, en un estudio sobre 735 autopsias de cáncer de mama, observó la existencia de nichos de anidamiento probables. A raíz de esta observación formuló la teoría del nicho pre-metastásico -o de "*Seed & soil*"- que conforma aún en día la base del entendimiento del proceso de diseminación tumoral. Esta teoría postula que la semilla -la Célula Tumoral Circulante- colonizará de manera selectiva el "suelo o *soil*" de órganos distantes en los cuales existe un ambiente favorable para su supervivencia. La adquisición de este ambiente favorable es lo que tradicionalmente se ha denominado el condicionamiento del nicho pre-metastásico como antesala del nicho metastásico maduro.

Este nicho viene determinado por una serie de características, algunas directamente vinculadas a la biología tumoral y otras influidas por la misma mediante la promoción de respuestas aberrantes en el tejido huésped (Figura 5)⁵¹⁻⁵³. Esta respuesta en términos generales puede ser englobada en función de sus características (Tabla 1). Todos estos procesos conforman un ambiente complejo en el que múltiples tipos celulares establecen relaciones tanto homo- como heterotípicas y en el que células genéticamente normales participan activamente de la progresión tumoral. En este contexto, el desarrollo del cáncer, y de la metástasis en particular, depende en gran parte de la habilidad de las células malignas de subvertir y explotar los procesos fisiológicos del huésped. Consecuentemente, la comunicación tumor-huésped se revela como un determinante crucial a la hora de determinar el devenir del proceso tumoral. Asimismo, dentro de esta comunicación tumoral, las vesículas extracelulares y los exosomas han ido progresivamente adquiriendo mayor relevancia a la hora de determinar la formación del nicho pre-metastásico⁵⁸.

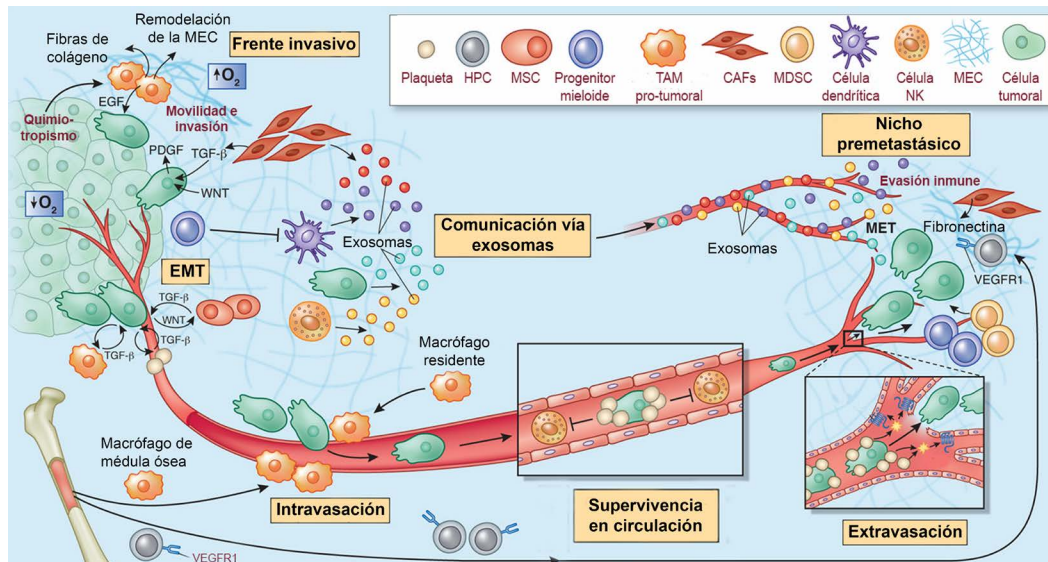


Figura 5. El microambiente tumoral participa en la diseminación y colonización tumoral. Macrófagos asociados a tumor (TAMs), plaquetas y Células Madres Mesenquimales (MSC) participan en la inducción de EMT en el tumor primario. Fibroblastos pro-tumorales (CAFs), TAMs y progenitores mieloides participan en la inmunosupresión tumoral. TAMs favorecen la extravasación tumoral mientras que las plaquetas participan en la protección, evasión del sistema inmune y extravasación de la célula tumoral en circulación. Simultáneamente, la comunicación vía exosomas participa en la evasión inmune y progresión de la célula tumoral. *HPC: Célula Hematopoyética Progenitora; MDSC: Célula Supresora Mieloide.* Adaptado de Quail & Joyce⁵¹.

Tabla 1. Características del microambiente tumoral

Características	Precusores
Remodelación de la MEC <i>Degradación de la MEC</i> <i>Reestructuración de la MEC</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Expresión de proteasas y MMPs - Deregulación de inhibidores de proteasas - Producción / activación de precursores de proteasas - Sobreexpresión de fibronectina - Sobreexpresión de integrinas - <i>Crosslinking</i> de la matriz de colágeno
Homeostasis pro-tumoral	<ul style="list-style-type: none"> - Inflamación crónica - Respuesta fibrótica
Expresión de señales órgano-específicas	<ul style="list-style-type: none"> - Quimio-tropismo - Reconocimiento celular
Descenso del seguimiento inmune	<ul style="list-style-type: none"> - Modulación del reconocimiento tumoral - Disfunción de las células T - Polarización de macrófagos - Inhibición citotoxicidad NK
Reclutamiento de precursores celulares <i>Fibroblastos asociados al tumor</i> <i>Células derivadas de médula ósea</i> <i>Células vasculares</i> <i>Macrófagos asociados a tumor</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Neo-vascularización - Aumento de la permeabilidad vascular - Acondicionamiento del nicho - Producción de quimio-gradientes - Reorganización del citoesqueleto

Adaptado de 52, 54-57

1.4. El exosoma y la diseminación metastásica

La primera referencia a los exosomas aparece descrita por Trams y colaboradores en 1981 como una serie de micro-vesículas con actividad enzimática exfoliadas de líneas de cultivo neoplásicas; siendo estudios posteriores los que definirían algunas de las características principales de esta población⁵⁹⁻⁶⁰.

Los exosomas se definen como una población de vesículas lipídicas de origen endosomal con un tamaño comprendido entre los 50 y 120 nm. Estas vesículas se originan en los denominados cuerpos multivesiculares (MVBs), los cuales, llegado el momento, se fusionarán con la membrana plasmática liberando los exosomas al medio extracelular (Figura 6)⁶¹. Atendiendo a su distribución encontramos que los exosomas están presentes en la inmensa mayoría de los fluidos biológicos no implicando necesariamente una función patológica (Figura 6). Es importante reconocer también que los exosomas forman parte de las denominadas vesículas extracelulares (EVs), pero no son parte exclusiva, sino que incluyen también vesículas de otra naturaleza como cuerpos apoptóticos o microvesículas con otro origen y función biológica⁶². Estas vesículas extracelulares han sido consideradas durante muchos años como contenedores de proteínas obsoletas y moléculas de desecho; y no es hasta la última década con la detección de mRNAs y miRNAs dentro del cargo exosomal cuando el exosoma ha atraído la atención sobre su influencia en la comunicación tumoral⁶³.

La biogénesis de los exosomas está regulada principalmente por el complejo ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) compuesto por 4 módulos que funcionan cooperativamente en la maduración de los cuerpos multivesiculares y la formación de las invaginaciones intraluminales que darán lugar a los exosomas⁶⁴. Adicionalmente, estudios realizados por Théry y colaboradores han demostrado la participación de la familia de proteínas Rab como reguladores claves del tráfico exosomal; habiendo asociado incluso Rab27 a la progresión tumoral^{65,66}.

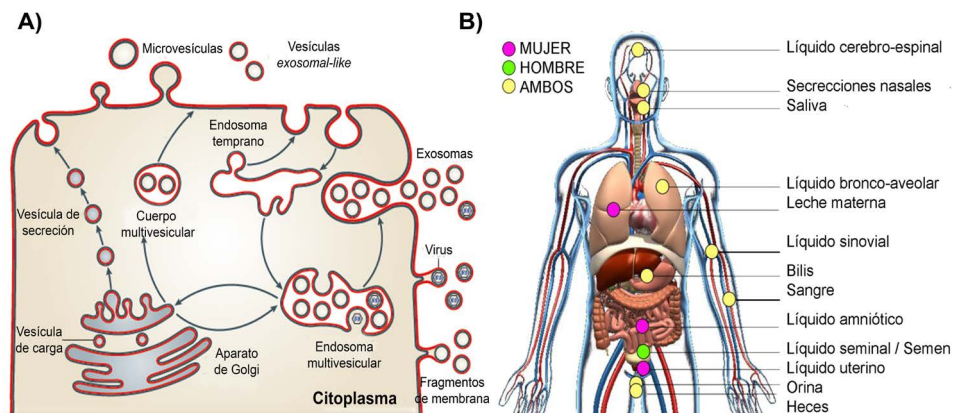


Figura 6. Origen de las vesículas extracelulares y su distribución. El tráfico intra-celular entre los distintos compartimentos celulares (vesículas de carga) o hacia la membrana plasmática (vesículas de secreción) se caracteriza por un contenido vesicular intraluminal. Las vesículas secretadas se caracterizan por un contenido citoplasmático. Podemos distinguir aquellas vesículas que tienen su origen en la membrana plasmática (microvesículas), origen viral o fragmentos de membrana. Alternativamente, existen vesículas que tienen su origen en compartimentos intra-celulares para ser liberadas al medio extracelular mediante su fusión con la membrana plasmática. Estas vesículas pasarán a denominarse exosomas una vez liberadas. Finalmente, algunos virus son capaces también de valerse de la maquinaria exosomal para su secreción. Adaptado de Théry *et al*⁶¹ y Yáñez-Mó *et al*⁶³.

Dentro del cargo exosomal se encuentran con frecuencia proteínas vinculadas a la familia de las tetraspaninas (CD9, CD63 y CD81 entre otras), el tráfico vesicular (miembros de la familia Rab) y el complejo ESCRT. Las tetraspaninas (TM4SF; *Transmembrane 4 superfamily*) conforman una familia de proteínas con 4 dominios transmembrana y un dominio extracelular altamente conservado participando como mediadores del reconocimiento celular, la selección del cargo exosomal y la liberación/internalización de vesículas. Se ha observado además cómo miembros de esta familia participan en la adhesión de la célula tumoral a la MEC participando en la activación de vías pro-tumorales⁶⁷.

En términos de estabilidad, los exosomas proporcionan una cubierta protectora a las moléculas incluidas en su cargo que previene su degradación y permiten, además de una comunicación loco-regional, una comunicación de mayor rango y con capacidad de generar un impacto sistémico. Una vez alcanzan la célula receptora, los exosomas pueden ser internalizados mediante endocitosis, fagocitosis, pinocitosis o simple fusión de membranas⁶⁸.

Al margen de los componentes estructurales, los exosomas son portadores de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos de distinta naturaleza constituyendo un complejo dinámico que refleja el tipo y estado de la célula del que procede. En este sentido, se ha identificado, por ejemplo, el antígeno asociado a tumor Mart-1 en exosomas procedentes de melanoma⁶⁹, la presencia de HER2 en células de cáncer de mama portadoras de la sobreexpresión esta proteína⁷⁰, o la secreción de TNF α vía exosomas en cardiomiocitos en hipoxia⁷¹. Todas estas observaciones conforman un escenario en el que el exosoma representa un perfil específico y dinámico que participa activamente en la progresión tumoral a la vez que constituye una oportunidad para la evaluación, tratamiento y seguimiento del proceso tumoral.

1.4.1. El exosoma y el nicho pre-metastásico

La participación del exosoma en la formación del nicho pre-metastásico ha atraído gran interés en los últimos años y ha permitido a su vez el establecimiento de vínculos entre esta población vesicular, la progresión tumoral y el pronóstico clínico^{72,73}. En esta dirección se observado una participación directa de las vesículas extracelulares y el exosoma en la adquisición de características que conforman el nicho pre-metastásico desde sus estadios más iniciales mediante la desestructuración de la MEC y el descenso del seguimiento inmune, hasta una etapa madura a través del reclutamiento de precursores pro-tumorales y el establecimiento de una homeostasis pro-tumorigénica en el tejido huésped^{72,73}.

La MEC está formada por dos componentes estructurales principales: la membrana basal y la matriz intersticial. En ambos dominios el colágeno constituye el componente estructural principal y sobre el que se incluyen glicoproteínas -como la laminina y la tenascina- y proteoglicanos que interaccionan con la matriz adyacente y las células residentes de la MEC. Estas células residentes se componen mayoritariamente de fibroblastos y miofibroblastos que se encargan de la producción de los componentes de la MEC y la integración de señales externas constituyendo la MEC un soporte dinámico sensible a factores externos y bajo constante remodelación⁷⁴.

Durante el pre-acondicionamiento tumoral, los exosomas han demostrado participar activamente en esta dinámica de desestructuración y remodelación de la MEC mediante la inclusión de MMPs o moléculas activadoras dentro de su cargo; o bien mediante la promoción de esta remodelación en células residentes^{75,76}. Son también varios los estudios que han conseguido establecer una asociación entre un perfil fibrótico de la MEC y el tráfico exosomal vía TGFβ⁷⁷. El reclutamiento de miofibroblastos vía exosomas -procedentes de la diferenciación de fibroblastos o precursores mesenquimales^{78,79}- origina un aumento en la producción y deposición de MEC mediada por TGFβ; el cual altera a su vez la función inmune y estimula la angiogénesis⁸⁰. Recientemente se ha reportado también la sobreexpresión de fibronectina, un componente fibroso de la MEC, vía exosomas⁷⁷. La fibronectina es capaz de mediar en la adhesión célula-MEC mediante su interacción con integrinas; las cuales han demostrado un papel clave a la hora de determinar el destino de las lesiones metastásicas⁸¹.

Sin embargo, la influencia del exosoma tumoral no se limita únicamente a la desestructuración de la MEC, sino que también son capaces de promover una respuesta pro-vasculogénica en el tejido endotelial. Se ha observado como exosomas tumorales son capaces de estimular la angiogénesis mediante la transferencia horizontal de EGFR a células endoteliales⁸². Grange *et al.* demostraron que exosomas tumorales son capaces de movilizar las células endoteliales hacia la formación de pseudo-capilares *in vitro*; además de estimular la expresión de MMP-2, MMP-9 y VEGFR⁸³. Adicionalmente, Peinado y colaboradores han demostrado un incremento de la permeabilidad del endotelio y el reclutamiento de precursores de médula ósea mediado por exosomas en células de melanoma⁷³.

Finalmente, se ha reportado también la participación del exosoma tumoral en la modulación del seguimiento inmune. Exosomas procedentes de cáncer de pulmón son capaces inducir la activación de macrófagos participando en la inflamación del nicho⁸⁴. Además, se ha observado cómo los exosomas tumorales participan en la modulación de la respuesta inmune limitando la actividad de las células T⁸⁵.

1.4.2. El exosoma y la Célula Tumoral Diseminada

No debemos olvidar sin embargo que la metástasis se trata de un proceso en la que no sólo existe una comunicación tumor-huésped, sino que esta comunicación se produce de manera bidireccional participando el nicho metastásico en la supervivencia de la célula tumoral diseminada.

En este sentido se ha observado cómo exosomas procedentes de distintos precursores del nicho pre-metastásico participan en la progresión de la lesión metastásica. La secreción de miRNA-223 vía exosomas por parte de macrófagos activados es capaz de incrementar la invasión y migración de distintas líneas de cáncer de mama⁸⁶; de manera similar Luga y colaboradores demostraron la capacidad de promover la movilidad y la formación de protusiones en células tumorales de cáncer de mama por medio de exosomas procedentes de fibroblastos. Coherentemente, la inyección conjunta de las células tumorales y fibroblastos incrementó su capacidad metastásica⁸⁷.

Exosomas procedentes de células estromales han demostrado incrementar la resistencia a terapia en cáncer de mama⁸⁸. Del mismo modo, se ha observado la promoción de dormancia vía exosomas en células de cáncer de mama⁸⁹. Se ha reportado también la transferencia *in vitro* de proteínas oncogénicas vía exosomas entre distintas células tumorales participando de este modo en la supervivencia tumoral⁹⁰.

Finalmente, los exosomas no sólo participan en la invasividad y supervivencia tumoral, sino que son también distintos los estudios que han reportado un incremento de la capacidad metastásica mediada por la transferencia de moléculas de adhesión entre las células tumorales y plaquetas⁹¹.

Todas estas observaciones ponen de relieve la influencia de la comunicación vía exosoma en el devenir de las lesiones metastásicas y la importancia de desarrollar estrategias dirigidas contra la misma.

Capítulo 2. La biopsia líquida

2.1. Utilidad clínica de la biopsia líquida

A día de hoy la toma de muestras de tejido representa la alternativa principal para la realización de análisis genéticos en la oncología clínica. Tradicionalmente estas biopsias se han venido realizando a través de punciones o aproximaciones quirúrgicas con el fin de extraer una muestra representativa del tejido tumoral. Sin embargo, este abordaje presenta una serie de limitaciones no presentes en la biopsia líquida. La biopsia líquida otorga una serie de posibilidades hasta hace poco no disponibles como son un acceso inmediato y poco invasivo, la posibilidad de la monitorización de la enfermedad o, además, su carácter global permite abordar la evaluación clínica dentro de la heterogeneidad tumoral (Tabla 2).

Si bien es cierto que la biopsia líquida ofrece múltiples ventajas, presenta también una serie de limitaciones derivadas de la escasez de moléculas diana en sangre. Además, quedan a día de hoy preguntas de carácter biológico que deben ser abordadas antes de una completa implementación de la biopsia líquida en clínica. Se desconoce por ejemplo si todos los tumores y metástasis producen ctDNA de manera homogénea o hasta qué punto estos niveles de ctDNA en circulación están influenciados por la localización tumoral -acceso a vasos sanguíneos por ejemplo-; del mismo modo se desconoce también qué subpoblaciones de la célula tumoral en circulación participan en la formación de las metástasis^{92,93}.

Tabla 2. Ventajas de la biopsia líquida como herramienta clínica

Ventajas de la biopsia líquida	Limitaciones de la biopsia de tejido
Alta accesibilidad <ul style="list-style-type: none"> - Mínima invasividad - Alta elegibilidad del paciente - Barato. De rutina. 	Accesibilidad limitada <ul style="list-style-type: none"> - Punción /Cirugía - Efectos secundarios adversos - Caro. Necesidad de equipamiento específico
Dinámica <ul style="list-style-type: none"> - Posibilidad de re-evaluación - Evaluación de la respuesta a tratamiento y desarrollo de resistencias - Seguimiento de la secuencia de acumulación de mutaciones 	Estática <ul style="list-style-type: none"> - Limitada por la cantidad de tejido disponible - Influida de la celularidad tumoral - Muestreo puntual
Sistémica <ul style="list-style-type: none"> - Evaluación de la heterogeneidad intra-tumoral - Evaluación de la heterogeneidad inter-metástasis 	Local <ul style="list-style-type: none"> - No siempre centrada en la parte más agresiva del tumor - Parcial. No considera heterogeneidad intra-tumoral
Aplicabilidad alta <ul style="list-style-type: none"> - Identificación de nuevas dianas terapéuticas - <i>Screening</i> / Diagnóstico temprano - Monitorización de la enfermedad 	Aplicabilidad limitada

Adaptado de Buder *et al.*⁹⁴ y Pantel & Alix-Panabières⁹⁵

2.2. Biomarcadores en circulación

La evaluación de biomarcadores tumorales en soporte líquido se ha basado generalmente en la detección de proteínas mayoritarias indicadoras de procesos tumorales. Algunos de estos marcadores se encuentran actualmente completamente implementados en clínica pero en ocasiones carecen de la sensibilidad y especificidad suficiente⁹⁶⁻⁹⁸. Durante los últimos años, un conocimiento más detallado de las bases moleculares del proceso tumoral junto con el desarrollo de nuevas tecnologías ha permitido la detección de alteraciones genéticas en muestras de sangre periférica, abriendo así un amplio abanico de posibilidades para el desarrollo de biomarcadores diagnóstico, pronóstico y predictivos en oncología.

Dentro del material genético contenido en la biopsia líquida se pueden distinguir varias fuentes de ácidos nucleicos de origen tumoral siendo las principales la Célula Tumoral Circulante, el ctDNA, los miRNAs y el exosoma^{94,99}.

2.2.1. DNA tumoral circulante

El plasma sanguíneo es contenedor de DNA en circulación no asociado a celularidad en lo que se ha denominado la población de *circulating cell-free* DNA (cfDNA). En procesos tumorales la cantidad de este cfDNA se ha observado incrementada asociada a un aumento en la cantidad de DNA de origen tumoral en circulación¹⁰⁰. Esta población de DNA tumoral circulante (ctDNA) se caracteriza por ser DNA de cadena simple o doble, con un tamaño aproximado de 180-200 bp., y que es liberado al torrente sanguíneo por células apoptóticas y necróticas¹⁰¹. En condiciones homeostáticas, la célula presenta mecanismos de reciclaje y asimilación de vesículas obsoletas sin embargo, durante la progresión tumoral, este proceso parece verse alterado o sobrepasado provocando la liberación de DNA tumoral al torrente sanguíneo^{102,103}. En consonancia con estas observaciones, se han reportado niveles elevados de ctDNA en tumores con gran componente necrótica y/o estadios avanzados¹⁰⁰. Paralelamente, son también algunos los autores que han propuesto una secreción activa de ctDNA al torrente por parte de las células tumorales¹⁰⁴.

Funcionalmente, se desconocen con exactitud los mecanismos que regulan la secreción, estabilización y función del ctDNA. Son varios los estudios que han conseguido establecer un vínculo entre la transferencia de ctDNA y la transformación tumoral en lo que se ha denominado la *geno-metástasis*, o lo que es lo mismo, la promoción de metástasis mediante la transferencia de DNA entre células tumorales y células bajo el microambiente tumoral¹⁰⁵. En este sentido, García-Olmo y colaboradores demostraron cómo el plasma de pacientes con cáncer colorrectal es capaz de transformar células NIH-3T3 -fibroblastos de ratón no tumorales- hacia un fenotipo tumoral capaz de originar masas tumorales *in vivo*¹⁰⁶.

Al margen de su actividad biológica, existe un gran interés clínico en el ctDNA como biomarcador del proceso tumoral. El análisis del ctDNA permite en potencia la detección de gran parte de las anomalías genéticas asociadas al tumor tales como mutaciones puntuales, alteración en el número de copias génicas, pérdida de heterocigosidad, inestabilidad de microsatélites o incluso modificaciones epigenéticas^{100,107}. Clínicamente, una evaluación precisa del

ctDNA permitiría su uso para el *screening* de pacientes de alto riesgo además de proporcionar herramientas para la monitorización tumoral y la respuesta a tratamiento^{95,101,108}. Destacan por ejemplo trabajos orientados al cáncer de pulmón donde Oxnard y colaboradores han sido capaces de predecir la resistencia a tratamiento en pacientes de NSCLC con *EGFR* mutado varias semanas antes de su progresión radiológica¹⁰⁸. Asimismo Murtaza y colaboradores han sido capaces de monitorizar la dinámica de incorporación de mutaciones en el ctDNA en pacientes con NSCLC recurrente pudiendo trazar aquellas anomalías conductoras de resistencia a terapia¹⁰⁹. Por otro lado, y vinculado al carcinoma endometrial, podemos destacar varios estudios recientes en cfDNA orientados a la detección de la mutación de *TP53* y *KRAS* en estadios tempranos poniendo de relieve su utilidad como marcador diagnóstico y pronóstico^{110,111}.

Por contra, la principal limitación del trabajo con ctDNA es la necesidad de un equipamiento altamente sensible y específico debido su baja concentración en circulación (<1% del cfDNA)⁹⁵. A día de hoy, la evaluación del ctDNA se hace fundamentalmente a partir de aproximaciones derivadas de la PCR digital que permiten una gran sensibilidad y entre las que cabe destacar la tecnología BEA-Ming¹¹²⁻¹¹⁴. Alternativamente, las tecnologías de secuenciación permiten un análisis altamente sensible pero que, por el contrario, resulta menos accesible y limita su implementación clínica¹⁰⁰.

2.2.2. La Célula Tumoral Circulante

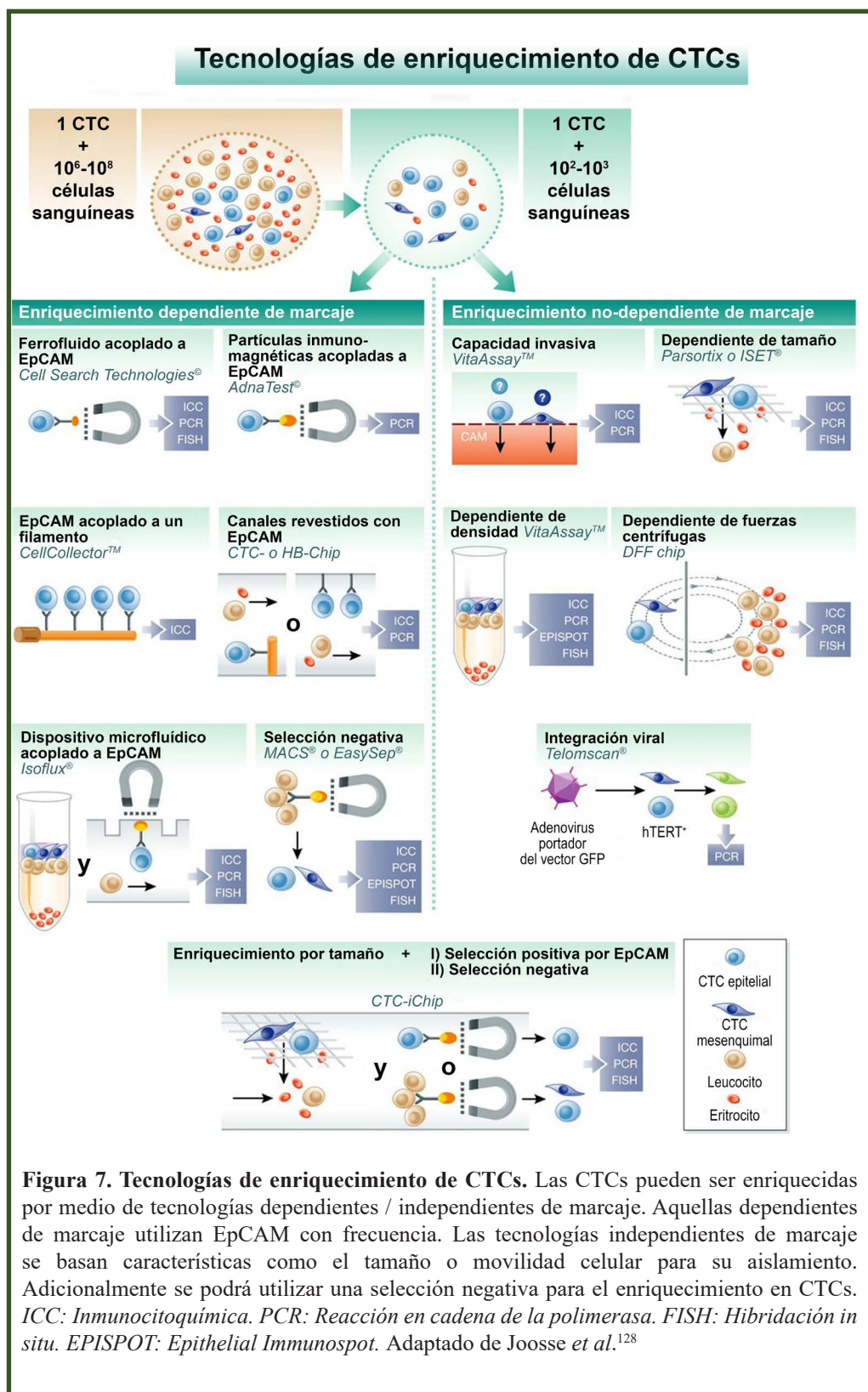
La Célula Tumoral Circulante representa aquella subpoblación tumoral que abandona el tumor primario y se incorpora a la circulación sanguínea y linfática. Es por ello, que la CTC constituye una suerte de biopsia de tejido tumoral contenida dentro de la biopsia líquida. La presencia de CTCs fue inicialmente descrita por Asworth en 1869¹¹⁵ y actualmente su correlación con el estadio tumoral y pronóstico clínico ha sido establecida en multitud de tipos tumorales¹¹⁶⁻¹¹⁸. Asimismo, el número de CTCs basal ha demostrado ser capaz de predecir el potencial metastásico en pacientes de cáncer de mama con diseminación temprana¹¹⁹ habiéndose detectado incluso la presencia de CTCs en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva antes de la detección clínica del CP¹²⁰. En este sentido, la enumeración de CTCs ha demostrado utilidad para

la predicción y la monitorización de la respuesta a terapia. Un descenso en el número de CTCs durante el tratamiento correlaciona con un mejor pronóstico y Supervivencia libre de progresión, mientras que su aumento se asocia a fenómenos de progresión y resistencia¹²¹⁻¹²³.

Adicionalmente, la caracterización molecular y genética de las CTCs abre la posibilidad para el rastreo de alteraciones genéticas, estratificación de pacientes y monitorización de respuesta a terapia centrada en aquella subpoblación originaria de las metástasis^{124,125}. En este sentido, Marchetti y colaboradores han conseguido reportar la mutación de *EGFR* en CTCs en el 94% de los pacientes de NSCLC portadores de esta mutación en la muestra sólida ofreciendo la posibilidad de una caracterización indirecta del tumor primario¹²⁶.

Actualmente el trabajo con CTCs está limitado por su bajo número en sangre y la necesidad de discriminar esta población de entre los distintos componentes de la sangre habiéndose estimado que existe una CTC por cada 10^6 - 10^8 células sanguíneas^{127, 128}. Es por ello necesario un proceso previo de enriquecimiento y purificación de la muestra. A día de hoy se han desarrollado multitud de tecnologías destinadas a la captura de CTCs (Figura 7)^{127,128} a través de métodos físicos orientados a una separación diferencial por tamaño, densidad o carga eléctrica o; por el contrario, tecnologías dirigidas basadas generalmente en el reconocimiento de EpCAM para el enriquecimiento y recuperación de CTCs; existiendo a su vez alternativas que permiten salvaguardar esta dependencia^{128,131}.

De entre los dispositivos disponibles cabe destacar la tecnología *CellSearch*®; siendo esta la única tecnología aprobada por la FDA (*Food & Drug Administration*) para la monitorización de cánceres metastásicos. *CellSearch*® permite la enumeración de CTCs procedente de 7,5 mL sangre periférica mediante su inmunoaislamiento con el marcador *EpCAM* (*Epithelial cell adhesion molecule*) y posterior tinción con un cóctel de citoqueratinas (CK8, CK18 y CK19) en combinación con un marcaje para PTPRC -un marcador hematopoyético- y un marcaje nuclear.



Es de resaltar también que dentro de la heterogeneidad tumoral se ha observado un nivel desigual de expresión de EpCAM -a menudo vinculado a EMT- y que pone de relieve la limitación de EpCAM como marcador único de aislamiento -además de la existencia de CTCs no derivadas de carcinomas-^{132,133}. En los últimos años se viene realizando un gran esfuerzo para el desarrollo alternativas EpCAM-independientes a la vez que se trata de determinar la influencia biológica de estas CTCs EpCAM- dentro del proceso tumoral.

Una vez enriquecidas las muestras en CTCs existen distintas alternativas orientadas a la obtención de un perfil biológico y molecular de estas CTCs -generalmente aproximaciones derivadas de la PCR, *microarrays* o secuenciación-. Además, en los últimos años se han venido incorporando tecnologías que permiten un abordaje individualizado de las CTCs permitiendo así una caracterización más precisa¹³⁴ y siendo algunos de estos dispositivos capaces de purificar CTCs de manera que conserven su viabilidad celular ofreciendo así la posibilidad de una evaluación *in vitro* e *in vivo* de esta subpoblación tumoral^{135,136}. Por último, el cultivo de CTCs, por su escasez, ha supuesto un reto durante años, sin embargo, en los últimos años son distintos los grupos que han conseguido establecer cultivos primarios de esta población celular siendo capaces incluso de generar masas tumorales en modelos animales¹³⁵⁻¹³⁷.

2.2.2.1. CTC vs. ctDNA

Si bien CTC y ctDNA son biopsiables de manera conjunta, la información que podemos obtener de ellas no es necesariamente la misma (Tabla 3). La evaluación de las CTCs está centrada en un subgrupo especialmente agresivo de células tumorales mientras que la evaluación del ctDNA no permite realizar abordar esta distinción. Asimismo, el análisis genético de las CTCs nos permite centrarnos en aquellas alteraciones moleculares relevantes para la progresión tumoral. Además, un análisis individualizado de cada CTC nos permite observar de manera directa la coexistencia de múltiples mutaciones dentro de una misma célula a la vez que permite descifrar la heterogeneidad tumoral célula a célula y trazar un mapa de la evolución tumoral. Finalmente, la CTC -al contrario que el resto de fracciones contenidas en la biopsia líquida- es una entidad viva ofreciendo la posibilidad de su aislamiento y caracterización *in vitro* e *in vivo*¹³⁸.

Tabla 3. Características de las CTCs y el ctDNA de interés clínico

	CTC	ctDNA
Equipamiento	Necesaria instrumentación específica	Ninguno
Aislamiento	Necesario enriquecimiento previo. Purificación de <i>single-cells</i>	No necesario. De rutina
Amplificación del DNA	Sí. Implica WGA (<i>Whole Genome Amplification</i>)	No
Información sobre heterogeneidad / clones	Sí. Análisis individualizado de distintas CTCs	No. Evaluación global
Dependencia de marcadores	Sí, dependencia de EpCAM. Sistemas EpCAM-independientes pendientes de validación	Independiente
Aplicabilidad en la investigación básica	Análisis célula-célula. Obtención de cultivos celulares. Ensayos <i>in vivo</i>	Puntual
Aplicabilidad en la clínica	Establecida para la enumeración de CTCs.	Potente. Pendiente de validación clínica

Adaptado de Heitzer et al.¹³⁹

Por contra, el manejo de las CTCs es sustancialmente más limitante implicando un abordaje técnico más complejo y caro. Esto hace del ctDNA una fracción con mucha mayor capacidad de implementación clínica y con flujos de trabajo más fácilmente asumibles¹³⁸.

2.2.3. microRNAs

Los microRNA (miRNAs) son RNAs no codificantes de pequeño tamaño que participan en la regulación de la expresión génica mediante la unión a secuencias complementarias del mRNA¹⁴⁰⁻¹⁴¹. La presencia de miRNAs fue oficialmente reconocida en 2001¹⁴² habiéndose detectado su presencia en circulación en 2008¹⁴³. Poco después, Lawrie y colaboradores reportaron la presencia de determinados miRNAs con valor clínico en pacientes oncológicos¹⁴⁴. A raíz de estas observaciones han sido muchos los estudios orientados a la utilización del miRNA circulante como biomarcador tumoral no invasivo.

Biológicamente, el origen de estos biomarcadores no está claramente establecido. Inicialmente se ha atribuido a una liberación a la circulación sanguínea como consecuencia de procesos inflamatorios y de daño celular. Sin embargo, la influencia de las vesículas extracelulares en la comunicación celular y la presencia de miRNAs dentro de su cargo ha abierto el debate sobre su origen. Actualmente, son algunos los trabajos que aluden a la comunicación tumoral como origen de una fracción de los miRNAs en circulación. Recientemente, una tercera alternativa, aboga también por una secreción activa vesícula-independiente de estos miRNAs. Si bien los ácidos ribonucleicos libres se caracterizan por su escasa estabilidad, los miRNAs en circulación parecen estar asociados a agregados proteicos que estabilizarían enormemente su estructura^{145,146}. En consonancia, se ha reportado la presencia de miRNAs en sobrenadantes de plasma previamente deplecionados de vesículas¹⁴⁷.

Son numerosos los miRNA propuestos como potenciales biomarcadores habiéndose establecido una vinculación con la biología tumoral para algunos de ellos¹⁴⁸. En cáncer de pulmón se ha identificado la expresión diferencial de varios miembros de la familia *let-7* miRNA en plasma y vesículas plasmáticas^{149,150}; implicando a su vez la participación de miembros de esta familia en la regulación de oncogenes como *RAS* o *MYC* en cáncer de pulmón^{151,152}. miR200c, un miRNA implicado en la regulación del proceso de EMT³⁶, también ha sido encontrado sobreexpresado en pacientes de NSCLC y cáncer de endometrio de mal pronóstico^{153,154}. La detección de estos miRNAs ha servido a su vez de soporte para el desarrollo de un test diagnóstico en plasma de pacientes de NSCLC de alto riesgo basado en la evaluación de 34 miRNAs distintos¹⁵⁵.

2.2.4. Vesículas extracelulares y exosomas

Las vesículas extracelulares (EVs) y los exosomas representan la última de las fracciones de la biopsia líquida que ha atraído la atención por su potencial clínico. En los últimos años, las EVs, y los exosomas en concreto, han demostrado ser contenedores de numerosas moléculas con actividad biológica (lípidos, proteínas, mRNAs, RNAs no codificantes, miRNAs, DNAs) demostrando algunas de las cuales una participación clave en la comunicación tumoral. El contenido proteico y ribonucleico de las EVs procedentes del plasma, así como

su número, se ha demostrado alterado en multitud de tipos tumorales destacando al plasma sanguíneo como vehículo de una población de EVs de origen tumoral^{73,77,156,157}, y abriendo así la posibilidad para su uso como plataforma para el desarrollo de nuevos biomarcadores de utilidad clínica.

Actualmente se desconocen grandes aspectos de la biología de las EVs. Tradicionalmente, la purificación de exosomas se ha limitado a un enriquecimiento en vesículas en un rango de tamaño de 50-120 nm por medio de una serie de centrifugaciones diferenciales¹⁵⁸. Este procedimiento no es específico y resulta también en la co-precipitación de agregados proteicos y otras vesículas de origen no exosomal¹⁵⁹. En los últimos años han aparecido multitud de alternativas destinadas a simplificar y estandarizar la purificación de exosomas aunque a día de hoy las alternativas disponibles presentan una serie de limitaciones que hacen su uso más o menos adecuado en función de los objetivos^{157,160-163}.

La ultracentrifugación de exosomas representa el abordaje más sencillo y con mayor rendimiento, pero su vez el menos específico. Para salvaguardar esta limitación es frecuente el uso de protocolos complementarios como la ultracentrifugación en gradiente de sucrosa que, si bien reduce el rendimiento total, permite la obtención de preparaciones de mayor pureza¹⁵⁸. El aislamiento mediante cromatografía de exclusión por tamaño representa también una alternativa para la purificación de exosomas no dependiente de marcadores ni de equipos de ultracentrifugación¹⁶⁴. Paralelamente, se han desarrollado abordajes basados en procesos de inmuno-afinidad que permiten un aislamiento específico de los exosomas en función de un determinado marcador proteico -principalmente miembros de la familia de las tetraspaninas o EpCAM-¹⁶⁰. Este abordaje presenta como principal ventaja la gran pureza de los aislados pero se encuentra limitado por la ausencia de marcadores exosomales específicos, la pérdida de subpoblaciones exosomales y el bloqueo de proteínas de membrana que pudieran limitar la funcionalidad del exosoma. Es por ello, que este abordaje está especialmente indicado para estudios de caracterización frente a estudios funcionales¹⁶².

Clínicamente, los exosomas presentan algunas características afines al ctDNA como es su accesibilidad o su presencia casi ubicua en líquidos biológicos; mientras que, por el contrario, presentan también algunas características compartidas con las CTCs como es la posibilidad de realizar estudios orientados al proteoma o la presencia de una bicapa lipídica que protege el cargo molecular. Atendiendo a sus características, los exosomas resultan especialmente interesantes en la búsqueda de biomarcadores nucleicos por su mayor abundancia en sangre que en el caso de las CTCs y por su mayor estabilidad e integridad que los ácidos nucleicos libres en circulación -habiéndose reportado por ejemplo la mutación de *BRCA2* en exosomas de una paciente no operable y cuyo ctDNA no permitió la obtención de material de calidad suficiente como para la identificación de la mutación¹⁶⁵-. Además, la mayor estabilidad de los ácidos nucleicos encapsulados permitiría su acumulación y evaluación en estudios más tempranos aumentando así su rango de aplicabilidad¹⁶⁵.

Biológicamente los exosomas son un reflejo del tumor del que proceden. En un estudio realizado por Taylor y colaboradores se identificó un perfil de miRNAs característico de células de cáncer de ovario a partir de sus exosomas permitiendo su uso como marcador tumoral¹⁶⁶. Además, son numerosos los estudios que han reportado un incremento en la expresión de marcadores de exosomas en circulación como consecuencia de la progresión tumoral llegándose incluso a establecer una correlación con el grado de diferenciación, estadio tumoral y supervivencia^{73,167}. Por otro lado, se ha reportado también un enriquecimiento del cargo exosomal en miRNAs¹⁶⁸, siendo numerosos los estudios que han vinculado la presencia de miRNAs asociados a microvesículas como indicadores de enfermedad^{169,170}. Alternativamente, son varios los estudios que han demostrado la posibilidad de detectar alteraciones genéticas en el RNA codificante de EVs¹⁷¹⁻¹⁷².

Por último, son distintos los autores que han destacado el uso de los exosomas, no sólo como biomarcadores tumorales, sino también una posible aplicabilidad terapéutica de los mismos. Estos exosomas en circulación pueden ser extraídos de un individuo y decorados o cargados con una molécula o fármaco específico para su re-administración proporcionando un vehículo resistente a la degradación, liposoluble y altamente específico¹⁷³.





HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





Capítulo 3. Hipótesis y objetivos

El proceso de metástasis representa un evento determinante en la práctica oncológica. Sin embargo, pese a su relevancia, las terapias dirigidas de manera específica a prevenir la progresión metastásica son limitadas. Biológicamente, la progresión metastásica se compone de una secuencia de etapas en las que el proceso tumoral establece una intensa remodelación del entorno y en el que, de acuerdo a la hipótesis de Payet de *Seed & soil*, la diseminación de la célula tumoral en circulación ocurrirá de manera preferente en órganos pre-acondicionados por este entorno, en lo que se ha denominado la formación del nicho pre-metastásico. El estudio aquí desarrollado parte de esta hipótesis con el objeto de profundizar en el conocimiento de la diseminación y anidamiento metastásico a través de dos de sus participantes: la Célula Tumoral Circulante, como principal responsable de la generación de metástasis a distancia; y el exosoma tumoral incluido en un marco de EMT, como herramienta de comunicación entre la célula tumoral, su entorno y partícipe del condicionamiento del nicho pre-metastásico.

Hemos utilizado el cáncer de pulmón NSCLC como modelo de trabajo altamente invasivo y con gran capacidad de diseminación para la caracterización de las CTCs; mientras que, por otro lado, hemos utilizado el cáncer de endometrio como punto de partida para el desarrollo de un modelo de invasividad tumoral guiado por EMT con el fin de realizar su caracterización y evaluar la influencia de este programa transcripcional en la comunicación y anidamiento tumoral.

Caracterización del perfil molecular de la Célula Tumoral Circulante (CTC) en Cáncer de Pulmón de Célula No-Pequeña (NSCLC)

- Inmunoaislamiento, enriquecimiento y caracterización de CTCs EpCAM+ en sangre periférica de pacientes de NSCLC avanzado
- Análisis de las funciones moleculares y rutas de señalización implicadas en la adquisición del perfil de CTCs en pacientes de NSCLC
- Identificación y validación de biomarcadores específicos de CTCs y determinación de su valor clínico en NSCLC

Obtención del perfil proteico de la línea de cáncer de endometrio HEC-1A en un marco de EMT

- Caracterización por SILAC del contenido proteico del proteoma, secretoma soluble y exosoma de la línea celular de cáncer de endometrio HEC-1A en un marco de EMT inducido por ETV5

Evaluación de la influencia del exosoma tumoral en el anidamiento de la Célula Tumoral Circulante al tejido endotelial

- Determinación del efecto del exosoma tumoral sobre el tejido endotelial en un escenario de diseminación y anidamiento tumoral
- Evaluación de diferencias funcionales en el exosoma tumoral derivadas de EMT





MATERIALES Y MÉTODOS





Capítulo 4.

Caracterización de CTCs en NSCLC y determinación de su valor clínico

4.1. Inmunocaptura y detección de CTCs

4.1.1. Selección de pacientes

Los pacientes incluidos en el estudio fueron diagnosticados con Cáncer de Pulmón de Célula No-Pequeña (NSCLC) avanzado (estadio III inoperable / estadio IV) de acuerdo a los criterios de la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC), la Sociedad Torácica Americana (ATS) y la Sociedad Respiratoria Europea (ERS). Todos los participantes fueron informados y dieron su consentimiento antes de su inclusión en el estudio de acuerdo al comité ético institucional (código 2008/277). Las muestras de sangre fueron tomadas en el *Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela* antes del comienzo del tratamiento con quimioterapia. Aquellos candidatos que hubieron recibido quimioterapia con anterioridad fueron descartados.

La cohorte de estudio incluyó 42 casos, encontrándose la enfermedad diseminada en 36 de ellos (Tabla 4). Las muestras fueron recogidas en tubos EDTA-BD Vacutainer (*BD Medical Supplies*; Franklin Lakes, NJ, USA) y procesadas en un plazo de 48 horas. Para la determinación del perfil de expresión génica de CTCs se reclutaron adicionalmente 10 pacientes con NSCLC avanzado y 4 donantes sanos de edad similar. 8 de los 10 nuevos pacientes presentaron enfermedad diseminada en el momento de su inclusión (Tabla 5).

Tabla 4. Características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio

		n=42	%
Género	Hombre	33	78,6
	Mujer	9	21,4
Consumo de tabaco	Fumador / Ex-fumador	34	91,9
	No fumador	3	8,1
Histología	Adenocarcinoma	32	76,2
	Carcinoma de células escamosas	10	23,8
Grado de diferenciación tumoral	Alto	2	4,8
	Moderado	10	23,8
	Indiferenciado	9	21,4
	Desconocido	21	50,0
Estadio tumoral	IIIA	3	7,1
	IIIB	3	7,1
	IV	36	85,7
Tamaño del tumor (T)	T0	2	4,9
	T1	5	12,2
	T2	9	22,0
	T3	7	17,1
	T4	18	43,9
Grado afectación nódulos linfáticos (N)	N0	5	11,9
	N1	1	2,4
	N2	16	38,1
	N3	20	47,6
Nº de metástasis	Ninguno	6	14,3
	<2	12	28,6
	≥2	24	57,1
Localización de la metástasis	Pulmón	15	35,7
	Ósea	14	33,3
	Hígado	9	21,4
	Glándulas supra-adenales	10	23,8
	Otro	11	26,2
Quimioterapia	Doblete de platino	38	92,7
	GEM-VNB	1	2,4
	ERLOTINIB	2	4,9

GEM-VNB: Gemcitabina-Vinorelbina

Tabla 5. Características clínico-patológicas de los pacientes empleados en el microarray de expresión génica

	G	Edad	Tabaco	Histología	Estadio tumoral	T	N	M	Localización de las metástasis	Quimioterapia
Paciente 1	H	74	Sí	SCC	IIIB	T4	N3	M0	-	Doblete de platino
Paciente 2	H	70	Sí	SCC	IIIB	T4	N3	M0	-	Doblete de platino
Paciente 3	H	62	Sí	Adenocarcinoma	IV	T3	N3	M1	Cerebro Nód. linfáticos	-
Paciente 4	M	61	-	Adenocarcinoma	IV	T2	N2	M1	Cerebro. Pulmón	Doblete de platino
Paciente 5	H	67	Sí	SCC	IV	T4	N2	M1	Páncreas. Supra-adenales	GEM-VNB
Paciente 6	H	53	Sí	Adenocarcinoma	IV	T3	N3	M1	Nód. linfáticos. Ósea. Pleura	Doblete de platino
Paciente 7	H	53	Sí	Adenocarcinoma	IV	T4	N3	M1	Pulmón. Hígado. Nód. linfáticos. Ósea	Doblete de platino
Paciente 8	H	73	Sí	Adenocarcinoma	IV	T3	N2	M1	Hígado. Ósea	Doblete de platino
Paciente 9	H	60	Sí	SCC	IV	T4	N1	M1	Ósea. Pleura Supra-adenales.	Doblete de platino
Paciente 10	H	68	Sí	SCC	IV	T3	N3	M1	Hígado	Doblete de platino

G: género; T: Grado de invasión tumoral; N: Grado de afectación ganglionar; M: Metástasis; SCC: Carcinoma de células escamosas

4.1.2. Enriquecimiento de CTCs y extracción de RNA total

El enriquecimiento de CTCs se realizó a través del kit *CELLlection™ Epithelial Enrich Dynabeads®* (DynaI, Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este kit permite el enriquecimiento en CTCs de una muestra de sangre mediante su inmuno-captura con partículas magnéticas funcionalizadas para el marcador epitelial EpCAM. Brevemente, se extrajeron 7,5 mL de sangre periférica de pacientes con NSCLC y controles sanos y se diluyeron en 15 mL de solución 2 (PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , BSA 0,1%, EDTA 2 mM) para la eliminación la fracción plasmática (1.250 g, 15', TA). Se añadieron nuevamente 7,5 mL de solución 2 y se incubó la fracción celular con las partículas magnéticas funcionalizadas en agitación (30', 4°C). Concluida la incubación, se recuperaron las CTCs bajo un campo magnético y se lavaron sucesivamente para la eliminación de aislamiento inespecífico (x3, PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , BSA 0,1%). Finalmente, las muestras enriquecidas de CTCs fueron lisadas, su RNA total estabilizado en 100 μL de la solución hipersalina RNA later® (Ambion; Foster City, CA, USA) y congelado a -80°C hasta su extracción.

La extracción de RNA total se realizó mediante el kit *Qiaamp® Viral RNA mini kit* (Qiagen NV; Hilden, AL) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este kit está orientado hacia el trabajo con muestras de muy baja celularidad lo que lo hace idóneo para el trabajo con CTCs. La extracción se realizó en ausencia de *carrier* y las alícuotas de RNA fueron eluidas en 60 μL de solución AVE (0,04% w/v azida sódica) y conservadas a -80°C hasta su uso.

4.1.3. Retrotranscripción

Para la obtención del DNA complementario (cDNA) se recurrió a una retrotranscriptasa de alta eficiencia (*Superscript III*, Invitrogen). Cada reacción incluyó una mezcla de 11 μL de muestra de RNA, 1 μL de *Random Hexamers* (*Applied Biosystems*; Foster City, CA, USA) y 1 μL de una mezcla de dNTPs 10 mM, a la que -tras denaturalización previa (65°C, 5')-, se añadieron 7 μL de mezcla de reacción (4 μL *First-strand buffer 5X*, 1 μL DTT 0,1 M, 1 μL *RNase OUT*, 1 μL *Superscript III*) para un volumen de final de 20 μL .

Incubada la reacción (25°C, 5'; 50°C, 2h; 70°C, 15') las muestras se trataron con *RNase H* para eliminar los restos de RNA (37°C, 20'; Invitrogen) y se conservaron a -20°C hasta su uso.

4.1.4. Pre-amplificación y RT-qPCR

Previo a la realización de la RT-qPCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) se sometió el cDNA a una reacción de pre-amplificación (*Taqman® PreAmp Master Mix Kit, Applied Biosystems*) con el fin de incrementar la sensibilidad de la reacción. Esta reacción permite la amplificación dirigida de fragmentos de cDNA de manera uniforme y sin introducir sesgos. Para ello, se añadieron 4,17 µL de cDNA a una mezcla de 3,28 µL de TE 1x por reacción y 0,07 µL de cada sonda *Taqman®* a pre-amplificar (M&M 6.4. Tabla 7) hasta completar un volumen de reacción de 12,5 µL. A continuación se añadieron 12,5 µL del preparado *Preamp Master Mix (Applied Biosystems)* para un volumen final de 25 µL. Esta mezcla se incubó durante 14 ciclos de amplificación (95°C, 10'; (95°C, 15''; 60°C, 4') x14) y se diluyó 1:10 en TE 1x antes de proceder a la RT-qPCR.

La PCR cuantitativa en tiempo real es una variante de la PCR que permite simultáneamente amplificar y cuantificar de forma absoluta el producto de amplificación mediante la incorporación de un oligonucleótido fluorescente (*Taqman®*, *Applied Biosystems*) dirigido de manera específica a una secuencia diana. Este oligonucleótido al ser incorporado libera el fluoróforo acoplado permitiendo medir la tasa de generación de uno o más productos específicos al final de cada ciclo de amplificación. Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos para las sondas correspondientes (M&M 6.4. Tabla 7) e incluyendo en todo caso duplicados y controles negativos. Cada reacción de amplificación se constituyó de 9 µL de cDNA diluido 1/4 en H₂O libre de nucleasas, 1 µL de la sonda *TaqMan®* correspondiente y 10 µL de *TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)*. Cada reacción de RT-qPCR estuvo compuesta por un ciclo de pre-amplificación (50°C, 2'; 95°C, 10') seguido de 40 ciclos de amplificación (95°C, 15''; 60°C, 1'). El equipo utilizado fue un termociclador *7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*.

Para su análisis, el nivel de expresión para las distintos genes se representa como $40 - C_t$ siendo 40 el número de ciclos de amplificación total y C_t (*Cycle Threshold*) el punto de intersección entre la curva de amplificación y el umbral de detección establecido ($C_t \text{ threshold} = 0,1$). Para la determinación de la carga de CTCs para cada muestra, los valores medios de expresión de *GAPDH* -un *housekeeping gene* indicador de celularidad- fueron sustraídos de la señal procedente de *PTPRC* -un marcador de célula hematopoyética- del mismo modo al utilizado por Barbazán y colaboradores¹⁷⁴.

4.2. Perfil de expresión de CTCs EpCAM⁺

Confirmada la presencia de CTCs en circulación en pacientes NSCLC se procedió a la determinación de su perfil de expresión por *Gene Expression Microarray* en 10 muestras independientes. El procedimiento empleado para el enriquecimiento de CTCs y extracción de RNA total fue el mismo al especificado en el punto M&M 4.1.2. para después proceder a la amplificación del transcriptoma completo de acuerdo al procedimiento indicado.

4.2.1. Amplificación del transcriptoma y *Gene Expression Microarray*

La amplificación del transcriptoma completo de las CTCs fue llevada a cabo con el kit *Whole Transcriptome Amplification* (WTA2, Sigma; St. Louis, MO, USA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se incorporó la máxima cantidad de RNA total para la creación de una librería de cDNA del transcriptoma para cada paciente / control, y a continuación se procedió a su amplificación por PCR (94°C, 2'; (94°C, 30"; 70°C, 5') x17).

La librería de cDNA resultante fue entonces marcada con el compuesto fluorescente Cy3® e hibridada sobre un *microarray* de expresión génica según las indicaciones del proveedor (*In Situ DNA Microarray 4x44 k*, Agilent Technologies; New Castle, DE, USA). La señal bruta fue recogida en un *Agilent scanner G2565B* (Agilent Technologies) y analizada de acuerdo a los criterios referidos a continuación.

4.2.2. Análisis de significación

El Análisis de Significación de *Microarrays* (SAM) fue realizado en colaboración con Gómez-Tato A. y Casares-de Cal MA., vinculados ambos a la Facultad de Matemáticas de la Universidad de Santiago de Compostela.

Los datos brutos fueron segmentados con el *software* proporcionado por el fabricante de acuerdo al protocolo GE1-v5_95 (*Agilent Feature Extraction Software v9.5, Agilent Technologies*). Un procesamiento inicial de los datos permitió limitar la saturación de la señal y la eliminación de señal de fondo de acuerdo a los criterios indicados^{175,176}. Aquellos genes que no alcanzaron alguno de los criterios de calidad fueron descartados: a) señal no uniforme o replicados dispares b) señal significativamente no diferente al fondo de señal c) señal en el rango de los controles negativos.

A continuación se procedió a la normalización por cuantiles de la señal del *microarray* con el *software* libre *Bioconductor*¹⁷⁷. Sólo aquellas señales por encima de 2^{11} unidades tras de su normalización fueron consideradas óptimas. Finalmente, aquellas sondas con ausencia de señal en más de un paciente fueron descartadas. Depurada la señal, se procedió a la búsqueda de secuencias significativamente más expresadas en pacientes que en controles de acuerdo al algoritmo de SAM incluido en el paquete de R *samr*¹⁷⁸.

4.2.3. Interpretación biológica de los datos

Los datos procesados fueron volcados en el *software Ingenuity Pathway Analysis 2.0* (IPA, *Ingenuity Systems*; Redwood City, CA, USA) para la determinación de rutas y funciones biológicas significativas. El test de Fisher de una cola empleado nos permite estimar la probabilidad de que una asociación establecida para nuestro set de genes se deba al azar. Adicionalmente, los datos fueron contrastados con la herramienta de acceso libre *GeneCodis3* para la determinación de las funciones más relevantes en el perfil de las CTCs de acuerdo a un test hipergeométrico corregido¹⁷⁹. La significación quedó establecida para un p valor $<0,05$ en ambos casos.

4.3. Validación y contraste con variables clínicas

4.3.1. Selección y validación de genes candidato

El análisis de función destaca la presencia significativa de genes vinculados a la ruta de Notch1 en el perfil de CTCs. De entre los genes vinculados a la ruta de Notch1 por IPA se seleccionaron una serie de candidatos (*LGALS3*, *PTP4A3* e *ITGB3*) contenidos en el perfil de expresión de CTCs para la validación por RT-qPCR del *microarray* y de la ruta de señalización de acuerdo a la metodología indicada en los puntos M&M 4.1.3. y M&M 4.1.4. *GAPDH* fue incorporado como normalizador celular y *PTPRC* se incluyó como normalizador de aislamiento inespecífico. Finalmente, *HES1* fue incorporado como efector *down-stream* de la ruta de Notch1 con el fin de certificar la activación de la ruta. La significación estadística se determinó de acuerdo a un Mann-Whitney *U-test* de dos colas. El *software* utilizado fue el *GraphPad Prism 6* (*GraphPad Softwares Inc.*; San Diego, CA, USA). El análisis de correlación *NOTCH1-HES1* se realizó a través del estadístico de Pearson. La significación fue fijada para un p valor <0,05 en todo caso.

4.3.2. Contraste con variables clínicas

El contraste clínico de los marcadores validados se llevó a cabo de acuerdo a las recomendaciones REMARK para la búsqueda y evaluación de marcadores¹⁸⁰. El análisis de ROC fue establecido para una distribución no paramétrica y un intervalo de confianza del 95%. La Supervivencia libre de progresión (PFS) y Supervivencia global (OS) se analizaron mediante *log-rank test* y la elaboración de curvas de Kaplan-Meier. La progresión temprana fue definida como aquellas progresiones acaecidas en los 4 meses siguientes al diagnóstico. El estadístico de Cox fue utilizado para la elaboración de los análisis univariantes y multivariantes para los marcadores y las variables clínicas. El *software* utilizado fue el *IBM SPSS Statistics 20.0* (*IBM Corp.*®; Chicago, IL, USA). Un p valor <0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

4.4. Inhibición de Notch *in vitro*

4.4.1. Cultivo celular: cáncer de pulmón

La línea humana inmortalizada de NSCLC A549 fue obtenida de la ATCC (ATCC® CCL-185™). Esta línea fue mantenida en cultivo en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Gibco; Grand Island, NY, USA) al 10% de Suero Fetal Bovino (FBS, Gibco), 1% (v/v) de penicilina (100 U/mL) -estreptomicina (100 µg/mL) (PenStrep, Gibco) y una atmósfera adecuada (37°C, 95% HR, 5% CO₂). Las células se subcultivaron de monocapas subconfluentes y dilución 1:8.

4.4.2. Proliferación en ausencia de sustrato

En la célula somática la ausencia de sustrato es un potente estímulo que favorece la entrada en apoptosis. Una de las características de la célula invasiva es su capacidad para sortear esta señal y proliferar en la ausencia de un sustrato firme. Para su evaluación se procedió al tapizado de la base de cada pocillo de una placa de P96 con 30 µL de agarosa *Low Melting Point* (V2111, Promega; Madison, WI, USA) al 0,6% (w/v). Una vez gelificado se añadieron 5x10³ células de la línea celular A549 contenidas en 100 µL de agarosa *LMP* al 0,3% (w/v). La agarosa se gelificó en medio DMEM al 2% de FBS. Las células se dejaron asentar durante 16h y a continuación se añadieron los tratamientos correspondientes para un volumen final de 100 µL de medio de cultivo FBS-. La inhibición de Notch1 se realizó mediante el inhibidor químico de γ-secretasa DAPT (CAS 208255-80-5. IC₅₀ 115 nM, *Santa Cruz Biotechnology*; Dallas, TX, USA).

Las células se cultivaron durante 4 días hasta su revelado en 50 µL de una dilución 1:10 de *Alamar Blue® Cell Viability Reagent* (DAL1025, Invitrogen). Finalmente, se midieron los valores de fluorescencia a 590 nm en un lector *FLUO Star Optima* (BMG Labtech; Ortenberg, AL). Las diferencias en proliferación se determinaron mediante su normalización a un control negativo. 5 replicados intra-experimentales fueron incluidos para cada muestra. La significación estadística se estableció para p <0,05 de acuerdo a un test de Wilcoxon.

Capítulo 5.

Caracterización del proteoma y fracción secretada de HEC-1A y H-ETV5

5.1. Obtención de exosomas de HEC-1A y H-ETV5

5.1.1. Cultivo celular: cáncer de endometrio

La línea de cultivo de cáncer de endometrio utilizada fue la HEC-1A (ATCC® HTB-112™). Esta línea procede de un adenocarcinoma de endometrio aislado en 1968 de una paciente con cáncer endometrial estadio IA. Presenta una morfología epitelial y características de cultivo adherentes.

A partir de esta línea celular, Monge y colaboradores generaron la línea celular H-ETV5 modificada para la sobreexpresión de ETV5 (EX-F080000-Lv105; NM_004454, *GeneCopoeia*; Rockville, MD, USA)⁴⁶. La sobreexpresión de ETV5 es capaz de inducir un proceso de EMT adoptando estas células un fenotipo pseudo-mesenquimal y altamente invasivo (Introducción 1.2.6.1). La selección del vector de sobreexpresión se mantuvo con G-418 (Geneticina® 500 µg/mL, Gibco).

De este modo se constituyó un modelo dicotómico en el que el fenotipo epitelial queda representado por HEC-1A y su contrapartida, con fenotipo mesenquimal y portador de la sobreexpresión de ETV5, H-ETV5.

Ambas líneas de cultivo se mantuvieron en medio McCoy's 5A (Gibco) suplementado al 10% FBS y 1% (v/v) de PenStrep (Gibco) en una atmósfera adecuada. El subcultivo se realizó por tripsinización y dilución 1:6-1:8.

5.1.2. Purificación de exosomas de medios condicionados

Para la obtención de los medios condicionados se establecieron unas rutinas de cultivo fijas para las líneas celulares HEC-1A y H-ETV5. La tasa de proliferación de ambas líneas celulares es equivalente sucediéndose un ciclo de división celular completo cada 22h. Las células fueron crecidas en medio completo hasta un 70% de confluencia, lavadas en PBS y posteriormente mantenidas durante 48h en medio FBS- para su condicionamiento. De cada placa se realizaron dos rondas de condicionamiento procesadas de igual manera.

La purificación de exosomas procedentes de medios condicionados se llevó a cabo de acuerdo a las directrices establecidas por Théry *et al*¹⁵⁸. Una vez los medios condicionados se limpiaron de impurezas por centrifugación diferencial se procedió al enriquecimiento de exosomas mediante su ultracentrifugación (100.000 g, 90', 4°C), lavado en PBS y posterior recuperación (Figura 8). Las centrifugaciones fueron realizadas en un rotor SW32Ti (*Beckman Coulter*; Brea, CA, USA). Una vez purificados los exosomas, se resuspendieron en la solución y volumen correspondiente y se procedió a su evaluación de rutina por *ZetaSizer Nano ZS* (M&M 5.2.3.). Las muestras generadas fueron conservadas a 4°C hasta su uso en un plazo inferior a 24h.

5.2. Caracterización de exosomas

El trabajo con exosomas es un campo en el que la forma de obtención y manejo de las muestras tiene gran influencia sobre los resultados. Adicionalmente, a día de hoy no existen procedimientos universales que permitan distinguir entre los distintos tipos de vesículas extracelulares siendo a menudo referenciado como exosomas lo que se trata de una suspensión enriquecida de distintos tipos de vesículas extracelulares. Existen sin embargo diversas pautas ampliamente aceptadas y que permiten acotar el trabajo con exosomas¹⁶².

5.2.1. Montaje de exosomas completos para microscopia electrónica TEM

Una vez ultracentrifugado el medio condicionado se procede a la fijación directa de los exosomas completos mediante su resuspensión en 50 μ L de PFA 2%. 5 μ L de esta suspensión es directamente depositada en varias rejillas de *formvar*-carbón, secada al aire durante 20-30' y lavada en PBS (x3). Por último, las muestras son contrastadas con ácido fosfotúngstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$; 5', TA, pH 6.8) y observadas al microscopio electrónico de transmisión (*JEOL 120KV mod. JEM2010, JEOL Ltd.*; Akishima, Tokio, JP) para la observación directa de los aislados de exosomas.

5.2.2. Marcadores de exosomas

Actualmente no se conoce la existencia de proteínas exclusivas del exosoma y cuya detección permita confirmar de manera inequívoca la naturaleza de los aislados. Se ha observado sin embargo una serie de proteínas cuya presencia aparece enriquecida en exosomas y que generalmente se utilizan para la certificar su aislamiento¹⁶². Dentro de este grupo aparecen proteínas de distinta naturaleza y entre las que destaca la superfamilia de las tetraspaninas

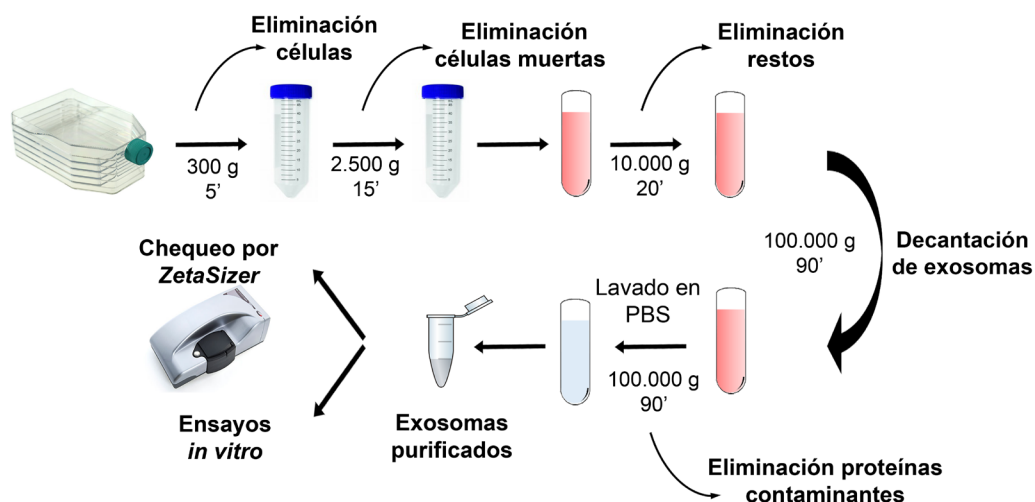


Figura 8. Flujo de trabajo empleado para el aislamiento de exosomas a partir de medios condicionados. Se eliminan secuencialmente las células arrastradas y muertas y restos celulares para después precipitar los exosomas por ultracentrifugación. A continuación se realiza un lavado en PBS para eliminar co-precipitados proteicos y se vuelven a recuperar los exosomas.

-como CD9, CD63 o CD81- implicadas en procesos de adhesión, reconocimiento y fusión de vesículas¹⁸¹. Asimismo PDCD6IP -también referida como ALIX- es una proteína de origen citosólico utilizada también como evidencia de un enriquecimiento exosomal.

Adicionalmente, la ausencia de marcadores específicos de exosomas hace más relevante si cabe la evaluación de determinadas proteínas “no deseables” en los aislados de exosomas. La detección de estas proteínas evidenciaría una obtención inadecuada de la muestra (la lisis celular por ejemplo liberaría gran cantidad de vesículas no deseables) o un procesamiento deficiente. HSP90B1 -también conocida como GRP94- es una proteína implicada en la estabilización y plegamiento de proteínas de nueva síntesis en el retículo endoplasmático por lo que su presencia se desaconseja en preparaciones de exosomas. Para su evaluación se realizó la detección de esta proteína en preparaciones de exosomas paralelamente a un control positivo constituido por 10 µg de un lisado celular.

La presencia de estos marcadores de exosomas fue confirmada / descartada por *Western Blot* de acuerdo a los protocolos indicados en el apartado M&M 6.3.5.3. y los reactivos correspondientes (M&M 6.4. Tabla 7). La detección de al menos de una de las tetraspaninas, una proteína citosólica y la ausencia de vesículas contaminantes es considerada como suficiente para certificar la naturaleza de los aislados.

5.2.3. Perfil de tamaño de exosomas

El *Zetasizer Nano ZS* (Malvern Instruments Ltd.; Worcerstershire, UK) es analizador de alto rendimiento que permite evaluar la dispersión de partículas en suspensión bajo el movimiento browniano y la convierte en una distribución de tamaño. En el caso de exosomas, la distribución de tamaño es variable en función del tipo celular, el procesamiento o el procedimiento de adquisición, sin embargo, existe un amplio consenso de que su tamaño oscila entre los 50-120 nm.

Para la valoración rutinaria de los purificados de exosomas se procedió a la estimación de la concentración y perfil de tamaño de los aislados de exosomas en una dilución 1:10 en PBS bajo unos parámetros fijos (25°C, ángulo de medida 173°, 5 repeticiones por medida, duración de la repetición 10'', atenuador fijo en 8). Las medidas fueron realizadas en cubetas de poliestireno ZEN0040 (*Malvern Instruments Ltd.*). Los perfiles representados representan la media de 3 medidas independientes. La estimación de la concentración de cada muestra se realizó a partir del número medio de cuentas por segundo (kcps) bajo las condiciones antes señaladas y un volumen conocido. Los tratamientos *in vitro* se realizaron de acuerdo a un ratio de dilución equivalente para los distintos ensayos y replicados.

5.3. Caracterización proteica por SILAC del proteoma, secretoma y exosoma de HEC-1A y H-ETV5

5.3.1. SILAC: *Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture*

El SILAC es una técnica proteómica que permite establecer diferencias en la abundancia relativa de proteínas específicas para una serie de muestras pareadas¹⁸². El SILAC se basa en la incorporación por parte células metabólicamente activas de aminoácidos marcados (*heavy*) frente a otra población crecida en presencia de sus equivalentes sin marcar (*light*) o de un peso inferior (*middle*). Este marcaje generalmente implica isótopos estables del hidrógeno (H^2), carbono (C^{13}) o nitrógeno (N^{15}) que, si bien químicamente se comportan de manera idéntica, sus diferencias atómicas sí son registrables por espectrometría de masas (MS). En el cultivo celular con estos isótopos, después de un número de divisiones celulares, la proteína marcada desplazará a la proteína sin marcar hasta conseguir un marcaje uniforme de todo el contenido proteico.

El SILAC proporciona además una serie de ventajas notables frente a otros abordajes proteómicos: 1) Parejas de péptidos químicamente idénticos, pero de diferente composición isotópica -es decir, procedentes de distintas poblacio-

nes- pueden ser discriminados por MS. El *ratio* de las intensidades para cada pareja de péptidos reflejará su abundancia relativa permitiendo así un análisis cuantitativo del contenido proteico. 2) El uso de un marcaje metabólico facilita el análisis de distintos subproteomas tal como el secretoma -estudio global de las proteínas secretadas- en el que dentro de un mismo medio condicionado distinguiremos entre aquellas proteínas secretadas por las células y aquellas proteínas de origen no celular o contaminantes (sin marcar). 3) La incorporación del marcaje durante el cultivo celular y el procesamiento simultáneo de los distintos marcajes reduce el sesgo derivado del manejo y análisis proteómico.

Con objeto de conocer el perfil proteico de la línea celular de cáncer de endometrio HEC-1A, frente a su homólogo mesenquimal y altamente invasivo H-ETV5, se abordó el estudio del proteoma celular. Adicionalmente, se analizaron aquellas proteínas que son secretadas al medio de cultivo, el secretoma. El término secretoma fue empleado por primera vez en el año 2000¹⁸³ y engloba al conjunto de moléculas -entre las que se incluyen las proteínas- que son producidas y secretadas por una célula, tejido u organismo en momento dado y bajo ciertas condiciones. Las proteínas secretadas constituyen un importante subproteoma y están codificadas por aproximadamente el 10% del genoma humano¹⁸⁴. Entre ellas encontramos componentes de la ECM y también moléculas reguladoras que participan en la mayoría de procesos fisiológicos, como la señalización celular, diferenciación, invasión, adhesión celular, angiogénesis o apoptosis¹⁸⁵. Adicionalmente, nuestro protocolo de procesamiento nos permitirá distinguir entre aquellas proteínas que son secretadas directamente al espacio extracelular (referido como secretoma soluble) y aquellas proteínas que son encapsuladas y liberadas formando parte de vesículas (exosomas).

De acuerdo al diseño experimental, la línea celular HEC-1A fue marcada con los aminoácidos de peso atómico *middle* (Lys4 y Arg6) frente a H-ETV5 que fue marcada con sus equivalentes *heavy* (Lys8 y Arg10). El marcaje de los aminoácidos L-Lys y L-Arg en combinación con la digestión en tripsina -que corta las proteínas de forma específica a nivel de estos dos aminoácidos- resultará en el marcaje de todos los péptidos de la muestra dando lugar a una huella peptídica específica de cada proteína. El análisis de la fracción exosomal incluyó además un *switch* del marcaje generándose también las fracciones

Exosoma *heavy* HEC-1A y Exosoma *middle* H-ETV5 con el fin de contrastar las cuantificaciones resultantes. Quedaron por tanto definidas las siguientes muestras para su análisis:

Tabla 6. Muestras generadas para su análisis por SILAC

Control secretoma <i>light</i>	Control exosoma <i>light</i>
Proteoma <i>middle</i> HEC-1A	Proteoma <i>heavy</i> H-ETV5
Secretoma <i>middle</i> HEC-1A	Secretoma <i>heavy</i> H-ETV5
Exosoma <i>middle</i> HEC-1A	Exosoma <i>heavy</i> H-ETV5
Exosoma <i>heavy</i> HEC-1A	Exosoma <i>middle</i> H-ETV5

5.3.2. Puesta a punto de las condiciones para SILAC

La formulación del medio de cultivo para SILAC es muy similar a la utilizada en el cultivo celular de rutina. Sin embargo, la incorporación de un marcaje metabólico implica algunas modificaciones en la rutina de cultivo que deben ser abordadas experimentalmente antes de la obtención de las muestras para análisis.

5.3.2.1. Acondicionamiento del cultivo

En el cultivo celular de rutina la fuente principal de aminoácidos proviene de la formulación del medio de cultivo. En el SILAC, el uso de aminoácidos L-Lys y L-Arg marcados requiere de la completa depleción de los isótopos naturales del medio de cultivo y la adición de manera externa de sus equivalentes isotópicos. La presencia de aminoácidos *light* en el medio de cultivo ocasionaría un descenso en la eficiencia del marcaje, por lo que se requiere de un medio de cultivo cuya síntesis no incluya L-Lys y L-Arg en su formulación junto con la diálisis del suero fetal bovino (dFBS) empleado para la depleción de trazas de estos aminoácidos. Este proceso de diálisis acarrea la pérdida de moléculas de pequeño tamaño tales como factores de transcripción, aminoácidos u hormonas que pueden afectar al crecimiento celular por lo que se hace necesaria una fase de acondicionamiento previa destinada a certificar la viabilidad y estabilidad de las células a marcar dentro de esta formulación.

El marcaje de ambas líneas celulares se realizó de acuerdo a las especificaciones del proveedor (Silantes; Munich, AL). Las células se mantuvieron en DMEM-SILAC + 1% (v/v) L-Glutamina 2 mM (Ref. 280001200) + 10% de dFBS (Ref. 281000800). Los aminoácidos Arg6 ($^{13}\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\cdot\text{HCl}$. Ref. 201203902), Arg10 ($^{13}\text{C}_6\text{H}_{14}^{15}\text{N}_4\text{O}_2\cdot\text{HCl}$. Ref. 201603902), Lys4 ($\text{C}_6\text{D}_4\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2\cdot 2\text{HCl}$. Ref. 211103913) y Lys8 ($^{13}\text{C}_6\text{H}_{14}^{15}\text{N}_2\text{O}_2\cdot\text{HCl}$. Ref. 211603902) se añadieron de manera externa en las combinaciones y concentraciones correspondientes.

5.3.2.2. *Determinación de la concentración de L-Lys y L-Arg*

Algunas líneas celulares tienen la capacidad de convertir L-Arginina en L-Prolina en presencia de un exceso del aminoácido -Arg es un precursor metabólico en la biosíntesis de la Pro-. De sucederse esta conversión durante el marcaje resultaría en la aparición inespecífica de L-Prolina marcada. Para prevenir esta reacción se procedió al ajuste de la cantidad de L-Arg disponible en el medio de cultivo durante el marcaje. Asimismo, la concentración de L-Lys fue ajustada con el fin de optimizar el procedimiento.

Para la determinación de una concentración suficiente pero no excesiva de estos aminoácidos se sembraron 1×10^5 células de la línea celular correspondiente y se cultivaron durante 5 días a concentraciones decrecientes de L-Lys y L-Arg. A tiempo final se determinó el número de células total por medio del fluoróforo vital *Alamar Blue® Cell Viability Reagent* (DAL1025, Invitrogen) adoptándose como concentración de marcaje la concentración mínima de estos aminoácidos que no afecta a la proliferación celular.

5.3.2.3. *Marcaje*

La literatura recomienda un mínimo de 5-6 doblajes para certificar un marcaje uniforme de las proteínas¹⁸². El marcaje se realizó a partir de 3×10^5 células y se fue siguiendo la acumulación de doblajes para ambas líneas celulares. Transcurridos 8 días -y un número equiparable de ciclos de división- se procedió a la toma de una alícuota celular para certificar la eficiencia del marcaje. Para ello, se incubó una fracción de cada línea celular en medio de cultivo FBS- durante 48h. A continuación, se recuperaron las células, lavaron en abundante

PBS (x3) y se lisaron 2×10^6 células en 100 μ L de urea 6 M / SDS 2%. Los restos de membrana fueron eliminados y el lisado celular conservado a -80°C .

Para la comprobación del marcaje se cuantificó la proteína total -*Bradford assay*- y una fracción de 5 μ g de proteína fue digerida en solución de tripsina de alta fidelidad (*Sequencing Grade Modified Trypsin, Roche*; 37°C , 16h). Concluida la digestión, se procedió a la eliminación de sales y restos de acrilamida en una resina de C18 (*ZipTip® Pipette Tips*; MF Millipore™, Billerica, MA, USA) para, finalmente, el análisis de los péptidos tripticos por LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*). La eficiencia del marcaje fue finalmente determinada a través de la relación entre los péptidos marcados -*middle* o *heavy*- frente a los péptidos sin marcar *light*. Confirmada la incorporación uniforme del marcaje se procedió a la obtención de las muestras definitivas acumulándose a su vez numerosos ciclos de división adicionales.

5.3.3. Procesamiento de las muestras para SILAC

Confirmado el marcaje se procedió a la expansión del cultivo celular hasta un número medio total de 6×10^7 células contenidas en 4 placas de cultivo P150 (aprox. 600 cm^2 de superficie) para cada línea celular y condición. Alcanzada una confluencia del 70%, se lavaron las células en abundante PBS (x3) y se mantuvieron durante 48h en ausencia de suero. Durante la obtención de las muestras se retiró también el cóctel de antibiótico del medio de cultivo.

Transcurridas 48h se recogieron los medios condicionados, se limpiaron secuencialmente de restos celulares e impurezas (300 g, 5', 4°C ; 2.500 g, 15', 4°C), para ser finalmente filtrados (\varnothing 0,22 μm , MF-Millipore™) y procesados como se especifica a continuación.

5.3.3.1. Muestras de proteoma

Recogidos los medios condicionados se procede a la toma de 2×10^6 células por tripsinización, lavado en abundante PBS (x3) y lisado en 100 μ L de solución de lisis (urea 6M / SDS 2%). Los restos de membrana fueron eliminados por centrifugación y el lisado celular congelado a -80°C hasta su análisis.

5.3.3.2. *Muestras de exosoma*

El procesamiento de las muestras de exosoma se llevó a cabo de acuerdo a las directrices referidas en el punto M&M 5.1.2. Una vez, limpio de impurezas el medio condicionado se procedió a la purificación del exosoma mediante su ultracentrifugación (100.000 g, 90', 4 °C, SW28 Beckman Coulter), lavado en PBS y posterior recuperación. Los precipitados de exosomas fueron entonces resuspendidos directamente en 30 µL de solución de lisis (urea 6M / SDS 2%), vortexados y conservados a -80 °C hasta su uso. Paralelamente, el sobrenadante resultante de esta centrifugación fue conservado para el análisis del secretoma soluble de acuerdo al procedimiento especificado a continuación.

5.3.3.3. *Muestras de secretoma soluble*

El análisis del secretoma soluble se realizó a partir del sobrenadante obtenido de la purificación de exosomas (M&M 5.3.3.2.). Este sobrenadante fue centrifugado durante 16h (100.000 g, 4°C, SW28 Beckman Coulter) para la completa depleción de componentes vesiculares. El sobrenadante fue a continuación recuperado, concentrado hasta 1 mL (2.500 g, 4°C, 30', Amicon Ultra-15 MWCO 10kDa, MF-Millipore™) y la proteína total precipitada en acetona (6 volúmenes, 16h, 4°C). Tras varios lavados en acetona (x3, 10', 4°C), el pellet resultante fue secado al aire, disuelto en 30 µL de solución de lisis (urea 6M / SDS 2%), vortexado y conservado a -80°C hasta su análisis.

Alternativamente, una fracción de este secretoma fue deplecionado de componentes vesiculares únicamente durante 90' en previsión por el deterioro de la muestra. El resto del procesamiento se desarrolló en paralelo bajo las mismas condiciones.

5.3.4. **Análisis proteómico de las muestras**

El estudio proteómico por SILAC de las distintas fracciones fue realizado en colaboración con Calamia V. perteneciente a la Plataforma de Proteómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de A Coruña (INIBIC).

Recogidas las distintas fracciones se procedió a la evaluación del estado y concentración de la proteína total de las mismas mediante tinción con nitrato de plata (M&M 5.3.4.1.) Confirmado su buen estado se procedió a su fraccionamiento.

Las muestras a analizar se constituyeron mezclando la misma cantidad de proteína *middle* y *heavy* para cada pareja de muestras. Las muestras de exosoma se cargaron con 5 µg de proteína total mientras que para el secretoma soluble y proteoma se cargaron 50 µg de proteína. A continuación, se procedió a su resolución en un gel de poliacrilamida al 10% (1D-SDS PAGE) y tinción en Coomassie coloidal. Brevemente, una vez resueltas las calles se fijaron en 50% metanol (30') y se tiñieron en azul de Coomassie (0,1% Coomassie G-250 / 50% metanol, 15'). El exceso de tinción fue retirado mediante sucesivos lavados en metanol 50% y H₂O. Las muestras en gel fueron entonces fraccionadas perpendicularmente a la dirección de migración para su digestión en gel (2 bandas para las muestras de exosoma y 16 bandas para las muestras de proteoma o secretoma). A continuación, se eliminó cualquier resto de tinción mediante sucesivos lavados en H₂O y ACN para finalmente deshidratar el gel, reducir los fragmentos (DTT 10 mM en NH₄HCO₃ 25 mM, 56°C, 45'), alquilarlos (IAA 50 mM en NH₄HCO₃ 25 mM, 15') y para finalmente digerirlos con tripsina de alta fidelidad 12,5 ng/µL (Roche, 37°C, 16h) en una misma solución de NH₄HCO₃ y de acuerdo al protocolo especificado por Shevchenko *et al*¹⁸⁶.

Concluida la digestión se procedió a la extracción de los péptidos trípticos en sucesivos lavados de ACN 50% / 0,2% TFA y posterior secado al vacío (*SpeedVac*[™]). Se eliminaron los restos de acrilamida y sales mediante *ZipTips* (*ZipTip*[®] *Pipette Tips*; MF Millipore[™]), se volvieron a secar las muestras y se reconstituyeron en 0,1% TFA para su fraccionamiento. Las fracciones peptídicas se separaron por cromatografía líquida de fase reversa en un NanoLC (*Tempo*, Eksigent; Dublin, CA, USA). Las muestras se pasaron a través de una pre-columna y una columna de sílica C18 de 300 Å (*New Objective*, Woburn, MA, USA) con un gradiente de 5-50% de ACN en 0,1% TFA y un flujo de 0,35 µL/min para un total de 90' de deposición. A continuación, se co-precipitaron los péptidos en una placa de MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption*) mediante un aplicador automático (*SunCollect*, *Sunchrome*; Friedrichsdorf, AL) junto con

una matriz de α -ciano (4 mg/mL en 70% ACN / 0,1% TFA; 1,2 μ L/min). Finalmente se procedió a la adquisición de los espectros de MS y MS/MS de los cromatogramas resultantes en un MALDI-TOF/TOF (4800 ABSciex; Framingham, MA, USA) de acuerdo a las condiciones referidas por Mateos *et al*¹⁸⁷. Se utilizó una intensidad fija de 3.600 kV y 1.500 disparos por fracción. La selección de los precursores para MS/MS se realizó usando un método *Job-Wide* (hasta 12 precursores por fracción, señal / ruido >80). La fragmentación de los péptidos se llevó a cabo para un voltaje de 4.400 kV y 2.000 disparos por espectro.

La identificación y cuantificación de los distintos espectros de masas y fragmentación se realizó de manera separada para cada muestra con el *software Protein Pilot 3.0* (ABSciex) y su contraste con la base de datos *UniProt_human*. Paralelamente se lanzaron en *UniProt_all* para la detección de posibles contaminaciones. Los parámetros de búsqueda fueron especificados para SILAC, alquilación con IAA, digestión en tripsina y como factores específicos se incluyeron la identificación basada en gel y denaturalización en urea.

El umbral de detección de proteínas fue establecido para 1,3 con una confianza del 95%. La determinación de la modulación viene determinada por la relación entre ambos marcajes *-middle* y *heavy*-. Un ratio $\geq 1,2$ (o $\leq 0,83$ en su defecto) fue considerado estadísticamente significativo. Por la metodología utilizada, la modulación positiva puede ser interpretada como la sobreexpresión en una determinada muestra o bien la subexpresión en la muestra pareada.

5.3.4.1. Tinción con nitrato de plata

La tinción con nitrato de plata (AgNO_3) permite una aproximación altamente sensible capaz de detectar cantidades de proteína del rango de nanogramos. Finalizada la electroforesis (1D- SDS PAGE) se procedió a la fijación de las muestras en una solución de 40% etanol / 10% acético durante 2h. El exceso de fijador fue lavado y el gel sensibilizado en tiosulfato sódico 0,02% (NaTio). A continuación, se tiñó el gel durante 30' en AgNO_3 0,2% y formalina al 0,075%. Durante la tinción los iones Ag se complejarán con la proteína y se reducirán formando un coloide que se depositará sobre las bandas de proteína. Por último, la tinción se reveló en 3% KCO_3 , 0,025% formalina y 12,5 mg/L NaTio durante 5-10' y se detuvo el revelado con Tris 3% / Acético 10%.

5.3.4.2. *Análisis de función para SILAC*

La evaluación de funciones, rutas e interacciones biológicas significativas procedentes del análisis proteómico por SILAC se realizó a través del *software Ingenuity Pathways Analysis 2.0* (IPA, *Ingenuity Systems*). El estadístico utilizado para la búsqueda de rutas y redes significativamente representadas fue el test de Fisher de una cola. Complementariamente estos datos fueron también contrastados por *GeneCodis3* y evaluados por un test hipergeométrico. La significación fue establecida para un p valor <0,05%.

Adicionalmente, los datos fueron contrastados en la base de datos *ExoCarta* (www.exocarta.org) orientada al trabajo con vesículas extracelulares y el *software* libre asociado *FunchRich 2.1.1*. (*Functional Enrichment Analysis Tool*, www.funrich.org)¹⁸⁸ para la elaboración de análisis de función y biodistribución.



Capítulo 6.

Impacto del exosoma tumoral en el anidamiento de la Célula Tumoral Circulante

6.1. Obtención de células endoteliales

6.1.1. Cultivo celular: células endoteliales

La línea celular endotelial EA.hy926 (ATCC®CRL-2922™) se empleó para la realización de ensayos de anidamiento tumoral *in vitro*. Esta línea procede de la hibridación de células somáticas endoteliales de la vena umbilical con células de la línea inmortalizada de cáncer de pulmón A549. EA.hy926 fue mantenida en cultivo en medio DMEM (Gibco) al 10% de FBS, 1% (v/v) de PenStrep (Gibco) y en una atmósfera adecuada. El subcultivo se llevó a cabo en diluciones de 1:8 y tripsinización de monocapas subconfluentes.

6.1.2. Cultivo celular: células primarias de vena umbilical (HUVEC)

Para la obtención de células HUVEC se tomaron pedazos de 10-20 cm de cordón umbilical fresco en PBS (4°C) y se dispuso a su inmediato procesamiento. Brevemente, tras retirar los extremos de cordón y limpiar en abundante PBS los restos de sangre e impurezas, se dispuso a la canulación y lavado de la vena umbilical. Una vez limpia la vena, se procedió al cebado de la misma con

colagenasa 22 U/mL (Gibco) e incubación durante 5' a 37°C. Un suave masajeo favorecerá el desprendimiento de las células endoteliales. Finalizada la incubación, se recuperaron las células endoteliales en medio de cultivo completo y se lavaron con suavidad. Las células obtenidas se decantaron (300 g, 5', TA) y sembraron en una placa tapizada con gelatina al 0,2% (*Gelatin from bovine skin type B* G932-100G, Sigma). Se dejaron adherir las células durante 16h y se lavaron con PBS (x3) para eliminar células contaminantes -glóbulos rojos mayoritariamente-. Una vez estabilizado el cultivo, estas células se mezclaron con 2-3 extracciones de HUVEC con el fin de constituir un *pool* de células.

El cultivo de estas células se realizó en *Endothelial Cell Basal Medium-2* (EBM®2 CC-3156, Lonza; Walkersville, MD, USA) suplementado con *EGM2 SingleQuots*® (CC-4176; FBS 10 mL, hidrocortisona 0,2 mL, hFGF-B 2 mL, VEGF 0,5 mL, R3-IGF-1 0,5 mL, ácido ascórbico 0,5 mL, hEGF 0,5 mL, GA-1000 0,5 mL, heparina 0,5 mL, Lonza) para un volumen de 500 mL. Las células se cultivaron a 37°C, 95% HR y 5% CO₂. El cultivo establecido no se utilizó durante más de 6 pases y con una dilución máxima de 1:6 en placas de cultivo previamente tratadas con gelatina 0,2% (Sigma). El medio de cultivo fue renovado cada 2 días.

6.2. Depleción de exosomas del suero

Alícuotas de 500 mL de FBS (Gibco) fueron descongeladas a 4°C y centrifugadas durante 16h (100.000 g, 4°C, SW28 Beckman Coulter) para la completa depleción de componentes vesiculares. El sobrenadante resultante fue filtrado (\emptyset poro 0,22 μ m, Millipore™) y congelado a -20°C en alícuotas de 55 mL hasta su uso.

No se observaron diferencias en la viabilidad y proliferación celular en el cultivo bajo depleción de exosomas para las líneas celulares indicadas.

6.3. El exosoma en el anidamiento tumoral

6.3.1. Adhesión a una superficie funcionalizada con exosomas

Los exosomas utilizados en estos ensayos fueron extraídos en paralelo para ambas líneas celulares y siguiendo la rutina de aislamiento referida en el apartado M&M 5.1.2.

La adhesión de las células tumorales a los distintos exosomas fue precedida por el tapizado de la superficie de una placa con 30 μ L de una preparación de exosomas en PBS para cada línea celular. Estos pocillos fueron dejados secar durante 24 h y, una vez fijados los exosomas al fondo de placa, se procedió a la siembra de 1×10^5 células en un volumen final de 100 μ L de medio de cultivo completo. La línea celular tumoral correspondiente fue previamente teñida con el colorante vital fluorescente calceína (*Calcein AM C3100MP*, Invitrogen) según el protocolo especificado por el fabricante. A efectos de estandarización y normalización se procedió a comprobar la uniformidad de la señal de calceína en todos los pocillos inmediatamente después de la siembra de las células tumorales. Transcurridos 45' se lavaron en PBS (x3) aquellas células no adheridas y se registró la señal fluorescente de las células remanentes en un lector de placas (485 nm, FLUO Star Optima, *BMG Labtech*; Ortenberg, AL). La fracción de células adheridas se determinó al normalizar la intensidad de fluorescencia con el valor obtenido a tiempo inicial. Todos los ensayos incluyeron controles negativos para los distintos grupos.

6.3.2. Adhesión a matriz extracelular

Se sembraron de 1×10^5 células de la línea celular tumoral correspondiente teñida con el fluoróforo calceína (Invitrogen) sobre los distintos sustratos de matriz incluidos en el *ECM Cell Adhesion Array Kit ECM540* (Millipore™). Se incubaron las células tumorales durante 45' y, tras lavados en PBS (x3), se determinó el número de células adheridas en función de la fluorescencia emitida.

6.3.3. Adhesión a monocapas endoteliales

Primeramente se procedió al cultivo de una monocapa de células de la línea endotelial immortalizada EA.hy926 o del cultivo primario de HUVEC. Se sembraron 2×10^4 células endoteliales por pocillo de P96 y se dejó formar y estabilizar la monocapa durante 16-24h. El tratamiento con exosomas se realizó en presencia de un 2% de FBS deplecionado de exosomas durante 8 horas (FBS Exo-16h, M&M 6.2).

Finalizado el tratamiento, se lavaron las monocapas y se añadieron 1×10^5 células tumorales H-ETV5 teñidas con calceína en medio completo. Se midió la señal de fluorescencia inicial (485 nm., *FLUO Star Optima*, BMG) y, tras incubar durante 45' y lavar en PBS (x3), se determinó el porcentaje de células adheridas a la monocapa endotelial.

6.3.4. Activación del endotelio con exosomas tumorales

Para la determinación de la activación endotelial como respuesta al tratamiento con exosomas se sembraron 5×10^4 células HUVEC o EA.hy926 en medio completo 16-24h antes de incorporar los tratamientos. Los exosomas se añadieron resuspendidos en EBM2 sin factores en 2% FBS Exo-16h y se incubaron durante 8h a 37°C y 5% de CO₂. Paralelamente al tratamiento con exosomas se incluyeron un control negativo y positivo de activación. El control positivo fue realizado mediante el tratamiento con TNF α 10 ng/mL (*Human-kine*[™], recombinant, expressed in hek 293 cells, Sigma). Acabado el tratamiento se lavaron los pocillos en PBS (x3) y se rascaron las células en presencia de una solución de lisis para la extracción de RNA total. Los lisados fueron congelados a -80°C hasta su uso.

6.3.4.1. Extracción de RNA total de cultivo celular

La extracción rutinaria de RNA total de líneas celulares se realizó con el *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche Applied Science; Indianapolis, IN, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente se procedió a la captura de los ácidos nucleicos en membrana, digestión con DNasa, lavado de proteínas y otros contaminantes; y finalmente solubilización y elución del RNA total.

6.3.4.2. Determinación del rendimiento de RNA total

La evaluación rutinaria del RNA total se llevó a cabo a través de la relación de $A_{260/280}$ en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific; Waltham, MA, USA). Los ácidos nucleicos presentan su máximo de absorbancia a 260 nm lo que, a través de la ley de Beer-Lambert, permite vincular la cantidad de luz absorbida de una muestra con su concentración. La relación $A_{260/280}$ nos permitirá además estimar la pureza de la muestra ya que proteínas, fenoles y otros contaminantes presentan una fuerte absorción a 280 nm. Una relación $A_{260/280} \approx 2,0$ es considerada como adecuada.

6.3.4.3. Retrotranscripción

La transcripción inversa es una reacción que implica la generación de una cadena de DNA complementario (cDNA) a partir de una cadena simple de RNA. Para ello se procedió a la adición de 1 μ g de RNA total de acuerdo a la siguiente fórmula para un volumen final de 20 μ L.

- 1 μ L *Random Hexamers* 50 μ M (ThermoFisher. Ref N8080127)
- 1 μ L *MuIV 5000 units* (ThermoFisher. Ref N8080018)
- 1 μ L *RNAase Inhibitor* (ThermoFisher. Ref N8080119)
- 2 μ L *dNTP Mix* 10 mM (ThermoFisher. Ref 18427013)
- 4 μ L *MgCl₂ solution* 25 mM (ThermoFisher. Ref 448224)
- 2 μ L *10x PCR Buffer II* (ThermoFisher. Ref 4376212)

La reacción se desarrolló durante 45' a 42°C, seguida de 5' a 95°C. Para su almacenamiento a medio plazo se conservaron las muestras a -20°C.

6.3.4.4. RT-qPCR

Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos para las sondas correspondientes (M&M 6.4. Tabla 7) incluyendo en todo caso controles negativos de reacción, medidas por duplicado y un *housekeeping gene* (*GAPDH*) con el que se normalizaron las distintas medidas. Cada reacción de amplificación se constituyó con 9 µL de cDNA diluido 1:4 en H₂O libre de nucleasas, 1 µL de la sonda *TaqMan*® correspondiente y 10 µL de la *TaqMan Gene Expression Master Mix* (*Applied Biosystems*). Cada reacción de RT-qPCR se compuso de un ciclo de preamplificación (50°C, 2'; 95°C, 10') seguido de 40 ciclos de amplificación (95°C, 15"; 60°C, 1'). El equipo utilizado fue un 7500 *Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*).

6.3.5. Expresión de proteína

6.3.5.1. Extracción de proteína total

Para la evaluación de la expresión proteica en células endoteliales se procedió al sembrado de 5x10⁵ células endoteliales y su cultivo durante 16-24h. El tratamiento de exosomas se añadió, previo lavado en PBS, resuspendido en EBM®-2 al 2% de FBS Exo-16h y 1% (v/v) de PenStrep (Gibco). Una vez tratadas las células se procedió a la recogida de la proteína total con ayuda de un *scraper* en 60 µL de solución RIPA (Tris-HCl 25 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, 1% NP-40, 1% DOC, 0,1% SDS) y en presencia de inhibidores de fosfatasa (NaF 4 mM, NaSOV₄ 2 mM, *Sigma Protease Inhibitor Cocktail* 1x y PMSF 1 mM). El lisado se incubó durante 10' en hielo en agitación para favorecer la lisis celular y finalmente se eliminaron los restos de membrana mediante su centrifugación (10.000 g, 5', 4°C). Las muestras se conservaron a -80°C hasta su uso.

6.3.5.2. Cuantificación de proteína total

El método utilizado fue la cuantificación por BCA (*Bicinchoninic Acid Solution B9643*, Sigma). Esta cuantificación combina la reacción de Biuret (reacción de la proteína con el ion Cu²⁺ en un medio alcalino para producir Cu⁺) con la formación de un complejo soluble de color púrpura al interaccionar el

BCA con el ion Cu^+ resultante. Este complejo exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm y su medida correlaciona robustamente con la cantidad de proteína. La extrapolación de esta absorbancia en función de una recta patrón de BSA (*Bovine Serum Albimun A9418*, Sigma) de concentración conocida nos permitirá la determinación de la cantidad de proteína total de nuestro extracto proteico

6.3.5.3. *Western blot*

El *Western Blot* es una técnica analítica que permite detectar proteínas específicas dentro de un extracto proteico. Para ello, 20-40 μg de proteína total fueron desnaturalizados (95°C , 5') en presencia de solución de Laemmli 1X (Sigma) y cargados en un gel de SDS-poliacrilamida al 7-10%. Las muestras se resolvieron durante 1h a 80-120V embebidas en una solución de electroforesis (Tris 25mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1% w/v). Una vez resuelto el gel, se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF, previamente activada en metanol, durante 1h 30' a 300 mA y en una solución de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, 20% metanol). Se tiñó la membrana con solución de Ponceau S (0,1% w/v en 5% ácido acético, Sigma) y se bloqueó la membrana en leche al 5% en TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 0,05%) durante 1h. A continuación, se procedió a la incubación con el anticuerpo primario correspondiente (M&M 6.4. Tabla 8; 16h, 4°C), lavado en TBS-T (x3, 10', TA) e incubación con el anticuerpo secundario correspondiente en TBS-T (1h, TA) y conjugado con la HRP (*Horseradish Peroxidase*) (M&M 6.4. Tabla 8). Una vez finalizada la incubación y lavado el exceso (x4) de anticuerpo se procedió al revelado del mismo mediante la detección de la señal bioluminiscente de la HRP (*Immobilon Western Blotting*, MF-Millipore™).

6.3.6. **Análisis estadísticos**

La recopilación y procesamiento de los datos brutos se realizó a través de los paquetes de *software* de *Microsoft Office 2013* para Windows. El análisis estadístico de los datos se realizó a través del *software GraphPad Prism 6.0* (*GraphPad Softwares Inc*; San Diego, CA, USA). La significación estadística ($p < 0,05$) fue determinada por el test de Wilcoxon.

6.4. Materiales suplementarios

Tabla 7. Sondas *Taqman*® empleadas en el estudio

	Gen	Sonda <i>Taqman</i> ®	Ref seq
Caracterización de CTCs	<i>HES1</i>	Hs00172878_m1	NM_005515.1
	<i>ITGB3</i>	Hs01001469_m1	NM_000212.2
	<i>LGALS3</i>	Hs00173587_m1	NM_001177388.1 NM_002306.3
	<i>NOTCH1</i>	Hs01062014_m1	NM_017617.3
	<i>PTP4A3</i>	Hs02341135_m1	NM_007079.3 NM_116000.1
Común	<i>GAPDH</i>	Hs99999905_m1	NM_002046.4
	<i>PTPRC</i>	Hs00894734_m1	NM_002829.3
Caracterización de exosomas de cáncer de endometrio	<i>ESR2</i>	Hs01100353_m1	NM_001040275.1 NM_001214902.1 NM_00124903.1 NM_001271876.1
	<i>ETV5</i>	Hs00231790_m1	NM_004454.2
	<i>GDF15</i>	Hs00171132_m1	NM_004855.2
	<i>ICAM1</i>	Hs00164932_m1	NM_000201.2
	<i>SELE</i>	Hs00950401_m1	NM_000450.2
	<i>SELP</i>	Hs00927900_m1	NM_003005.3
	<i>SNAI1</i>	Hs00195591_m1	NM_005985.3
	<i>TGFB1</i>	Hs00998133_m1	NM_000660.4
	<i>VCAM1</i>	Hs01003372_m1	NM_001078.3 NM_001199834.1 NM_080682.2
	<i>ZEB1</i>	Hs01566407_m1	NM_001128128.2 NM_001174093.1 NM_001174094.1 NM_001174095.1 NM_001174096.1 NM_030751.5
	<i>ZEB2</i>	Hs00207691_m1	NM_001171653.1 NM_014795.3

Tabla 8. Anticuerpos utilizados para *Western blot*

Antígeno /Epítipo	Dilución	Proveedor
α -actina	1:1000	<i>Abcam; Cambridge, UK</i>
ALIX (NB-100-65678)	1:500	<i>Novus Biologics; Littleton, CO, USA</i>
CD81 (sc-7637)	1:500	<i>Santa Cruz Biotech.; Dallas, TX, USA</i>
CD9 (sc-13118)	1:500	<i>Santa Cruz Biotech.; Dallas, TX, USA</i>
HSP90B1 (NBP1-04346)	1:500	<i>Novus Biologics; Littleton, CO, USA</i>
VCAM1 (sc-1504)	1:500	<i>Santa Cruz Biotech.; Dallas, TX, USA</i>
Anti-Mouse HRP	1:1000	<i>Santa Cruz Biotech.; Dallas, TX, USA</i>
Anti-Goat HRP	1:1000	<i>Santa Cruz Biotech.; Dallas, TX, USA</i>



RESULTADOS





Capítulo 7.

El perfil molecular de las CTCs identifica *NOTCH1* como un regulador principal en NSCLC

7.1. Caracterización de CTCs en NSCLC avanzado

7.1.1. Inmunoaislamiento de CTCs

La presencia de CTCs en pacientes con NSCLC avanzado fue determinada mediante el inmunoaislamiento de CTCs y la evaluación de la expresión por RT-qPCR de *GAPDH* y *PTPRC* en una cohorte de 42 pacientes de NSCLC y 16 controles sanos (M&M 4.1.1.).

GAPDH es un *housekeeping gene* de referencia caracterizado por una expresión estable dentro la célula. *PTPRC* por su parte es un marcador de célula hematopoyética por lo que su uso como normalizador frente a *GAPDH* nos permite demostrar la presencia de una población adicional en las muestras de pacientes cuando comparadas con muestras procedentes de controles sanos (p valor<0,001, Figura 9A). Consistentemente, la expresión de *PTPRC* no demostró diferencias significativas cuando contrastados los niveles de detección RT-qPCR; evidenciando así un aislamiento inespecífico de células hematopoyéticas equiparable en ambos grupos muestrales (p valor=0,308; Figura 9B).

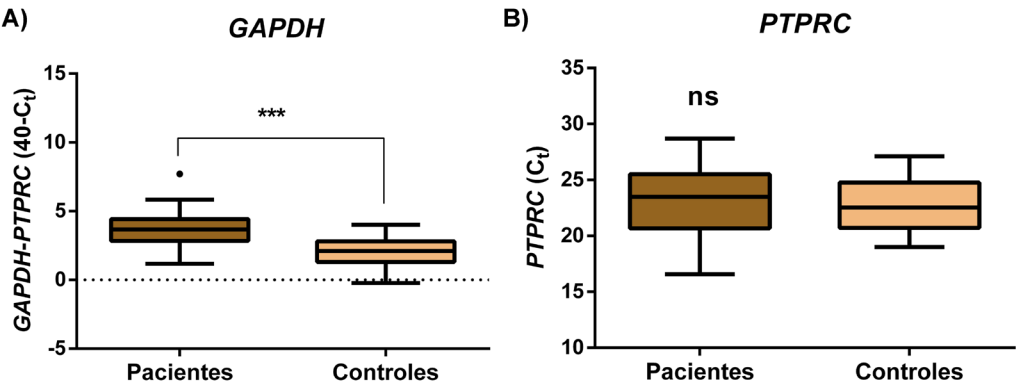


Figura 9. La sangre procedente de pacientes de NSCLC avanzado contiene CTCs. Expresión de *GAPDH* y *PTPRC* por RT-qPCR para la cohorte pacientes de NSCLC (n=42) y controles sanos (n=16). Señal de *GAPDH* normalizada a la señal de *PTPRC*. Niveles de expresión representados como 40-C_t.

Adicionalmente, Barbazán y colaboradores¹⁷⁴ demostraron que el valor de expresión de *PTPRC* en eluidos procedentes del inmunoaislamiento no muestra diferencias de expresión, descartando así una expresión diferencial procedente de la población no-CTC. Por último, la expresión de *PTPRC* ha demostrado no poseer potencia estadística a la hora de discriminar entre aquellos pacientes que sufrirán una progresión temprana (progresión inferior a 4 meses) (AUROC: 0,522); mientras que *GAPDH*, indicador indirecto de la carga de CTCs, sí que presenta capacidad para discriminar entre aquellos pacientes que sufrirán una progresión temprana (AUROC=0,747; Figura 10).

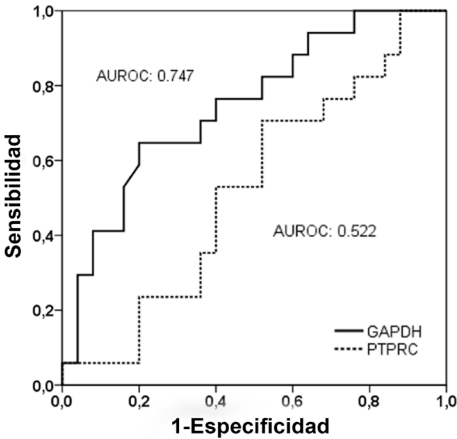


Figura 10. Área bajo la curva para *GAPDH* y *PTPRC* para progresión temprana en pacientes de NSCLC avanzado. El nivel de detección de *PTPRC* por RT-qPCR no es capaz de predecir la progresión temprana en nuestra cohorte de pacientes (n=42).

7.1.2. Determinación del perfil de expresión génica para CTCs en NSCLC

Una vez confirmada la presencia de CTCs en pacientes con NSCLC avanzado se procedió a la determinación del perfil de expresión de esta población de CTCs. Para ello se seleccionaron 10 pacientes de NSCLC avanzado para su hibridación en un *microarray* de expresión génica junto con 4 controles sanos que nos permitan sustraer la señal procedente del aislamiento inespecífico del mismo modo que el descrito por Barbazán *et al*¹⁷⁴. El flujo de trabajo para el aislamiento y determinación del perfil de expresión génica para CTCs viene esquematizado en la Figura 11.

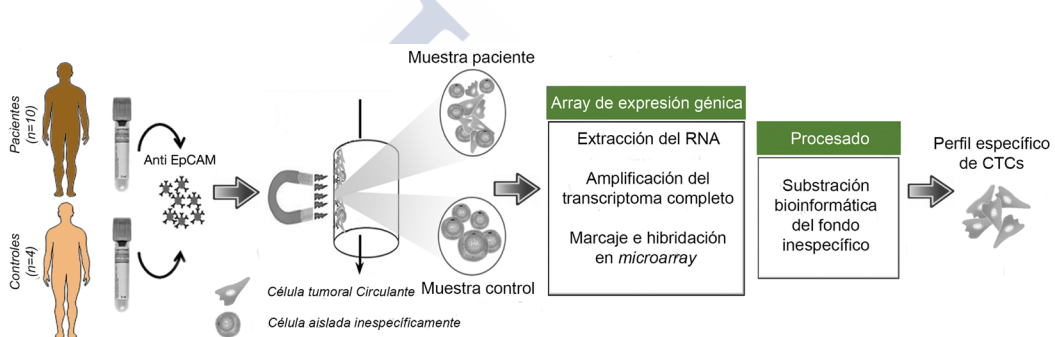


Figura 11. Flujo de trabajo utilizado para la caracterización del perfil de expresión de CTCs en NSCLC avanzado. 7,5 mL de sangre de pacientes de NSCLC y controles sanos es incubada con partículas magnéticas funcionalizadas con EpCAM. Las muestras de pacientes contendrán aquellas CTCs EpCAM+ recuperadas específicamente junto con células aisladas de manera inespecífica. Las muestras de controles contendrán únicamente esta última población. El RNA total es extraído, el transcriptoma completo amplificado y el cDNA resultante hibridado sobre un *microarray* de expresión génica. La captura y procesamiento de los datos nos permitirá obtener un perfil de expresión específico de CTCs de NSCLC. Adaptado de Barbazán *et al.*¹⁷⁴

Previo a la hibridación en *microarray* fue necesaria la creación de una librería de cDNA del transcriptoma completo a partir del RNA total procedente de muestras enriquecidas en CTCs; habiendo demostrado Barbazán *et al.*¹⁷⁶ la linealidad del proceso no alterándose la composición del transcriptoma. El cDNA resultante fue entonces hibridado sobre un *microarray* de expresión génica. La señal procesada resultó en 2.392 secuencias (7,01%) acordes a los criterios de calidad. La señal media fue de 60.889 unidades siendo 76.597 y 16.979 las señales medias para la cohorte de pacientes y controles respectiva-

mente. La normalización de los datos arrojó 1.810 sondas con una expresión superior a 2^{11} en al menos 8 pacientes y 2 controles; de las cuales 853 sondas resultaron significativamente más detectadas en el grupo de pacientes para un *False Discovery Rate*=0% y $\Delta=2,46$. Finalmente, sólo aquellas sondas con un *log2 ratio* superior a 1,5 fueron consideradas resultando 305 secuencias. Aquellas sondas detectadas únicamente en pacientes y con una señal conforme a los criterios de calidad fueron incluidas también en los análisis (Tablas S7 y S8 incluidas en el CD adjunto).

Paralelamente, el Análisis de Componentes Principales de los datos cribados nos permite identificar las muestras de pacientes de NSCLC como una población con un perfil de expresión diferente de las muestras de controles sanos (Figura 12).

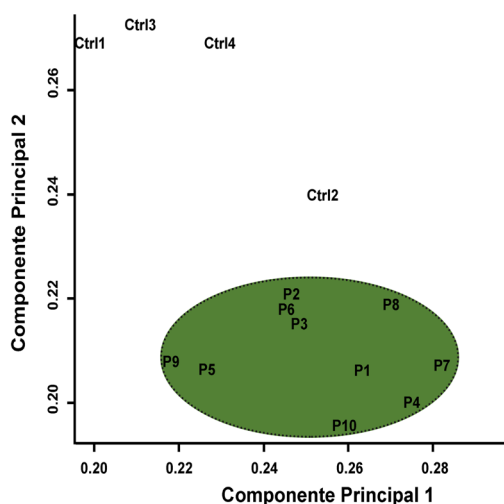


Figura 12. Análisis de Componentes Principales para las muestras incluidas en el *microarray*. Las muestras procedentes de pacientes de NSCLC (n=10) presentan un perfil de expresión diferente respecto al identificado en controles sanos (n=4).

7.1.3. Biología de las CTCs EpCAM⁺ en NSCLC avanzado

Para la interpretación biológica de los datos del *microarray* se procedió a su contraste con el *software* asociado a *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA). Un análisis funcional de los genes cribados destaca la presencia significativa de funciones vinculadas al movimiento celular, la supervivencia y el desarrollo, el crecimiento y proliferación celulares (Tabla 9). Podemos observar a su vez cómo estas funciones aparecen fundamentalmente orquestadas por las rutas PI3K/AKT, ERK1/2 y NFkB siendo *NOTCH1* un componente destacado dentro de esta red funcional (Figura 13).

Tabla 9. Funciones significativamente representadas en el perfil de expresión de CTCs para NSCLC avanzado

Categoría	Función	Moléculas	p valor
Movimiento celular	Migración de células tumorales	Akt, CCL19, CD3, CDX1, ERK1/2, ITGB3, KRT8, LGALS3, MUC4, NFkB, NOTCH1 , P38, MAPK, PI3K, PTP4A3, SENP1, SPHK1	5,90x10 ⁻⁶
	Movimiento de las células tumorales	Akt, CCL19, CD3, CDX1, ERK1/2, ITGB3, Jnk, KRT8, LGALS3, MUC4, NFkB, NOTCH1 , P38, MAPK, PI3K, PTP4A3, SENP1, SPHK1	3,74x10 ⁻⁵
Muerte celular y supervivencia	Necrosis	Akt, APOL1, ATM, CCL19, CD3, CDX1, DIABLO, DNM1, ERK1/2, IgG, Interferón α, ITGB3, Jnk, KRT8, LGALS3, MAP3K10, MUC4, NFkB, NGFRAP1, NOTCH1 , P38 MAPK, PI3K, PTAFR, SENP1, SLC6A3, SPHK1	8,24x10 ⁻⁵
Desarrollo celular, crecimiento y proliferación celular, desarrollo de tejidos	Proliferación de células epiteliales	Akt, C8orf44-SGK3/SGK3, ERK1/2, ITGB3, NOTCH1 , PI3K, PTAFR, SPHK1	9,55x10 ⁻⁵

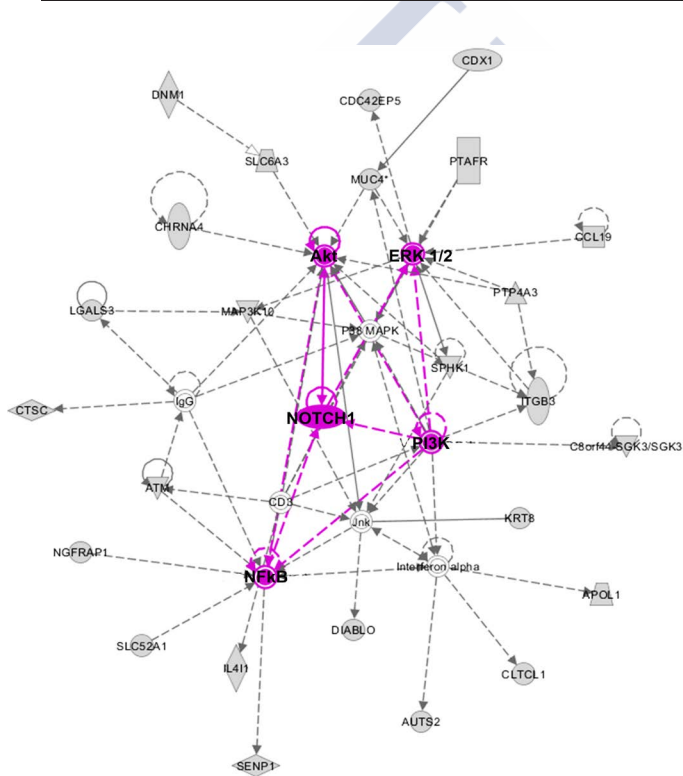


Figura 13. Red de interacción para las funciones de movimiento, desarrollo, crecimiento y proliferación celulares contenidas en el *microarray* de expresión de CTCs de NSCLC. *NOTCH1* aparece como uno de los genes orquestando esta red de interacción.

Paralelamente, un análisis ontológico por *GeneCodis3* destaca la presencia de secuencias implicadas en procesos de adhesión celular, desarrollo y la organización de la matriz extracelular además de una activa función de transporte y transducción de señales (Tabla 10).

Tabla 10. Funciones destacadas en el perfil de expresión de CTCs por *GeneCodis3*

Función	Moléculas	p valor
Transducción de señales	MAP3K10, TNR, CSNK1E, CASKIN1, MAP3K6, MCC, PLEKHG5, SPHK1, ARGHGAP33, P2RX1, CLTCL1, CHRNA4, GPSM1, ATM, CHKA	<0,01
Transporte transmembrana	HCN2, SLC14A2, SLC26A1, SLC11A1, KCNH3, MFSD10, SLC24A16, SLC6A3, SLC39A5, SFXN5	<0,05
Adhesión celular	TNR, COL11A2, PDZD2, CASS4, KIRREL2, SORBS3, GP9, MUC4, PGM5	<0,05
Diferenciación celular	MDFI, NHLH2, CATSPERG, NKX2.5, LGALS3 , GPSM1, SCXA	<0,05
Desarrollo embrionario	MDFI, FOXP3, NOTCH1 , DLK1	<0,05
Organización de la matriz extracelular	TNR, OLFML2A, APBB2, LGALS3	<0,05

Finalmente, la activación de *NOTCH1* en nuestras muestras enriquecidas en CTCs de pacientes de NSCLC fue confirmada por RT-qPCR (p valor<0,001; Figura 14A). Asimismo, la expresión de *HES1*, un gen efector *down-stream* en la ruta de Notch1, resultó significativamente incrementada en pacientes (p valor=0,041; Figura 14B) estableciéndose una correlación positiva con los niveles de expresión de *NOTCH1* (p valor=0,003; Figura 14C). Estos resultados confirman la relevancia de *NOTCH1* en el perfil de expresión de las CTCs en NSCLC.

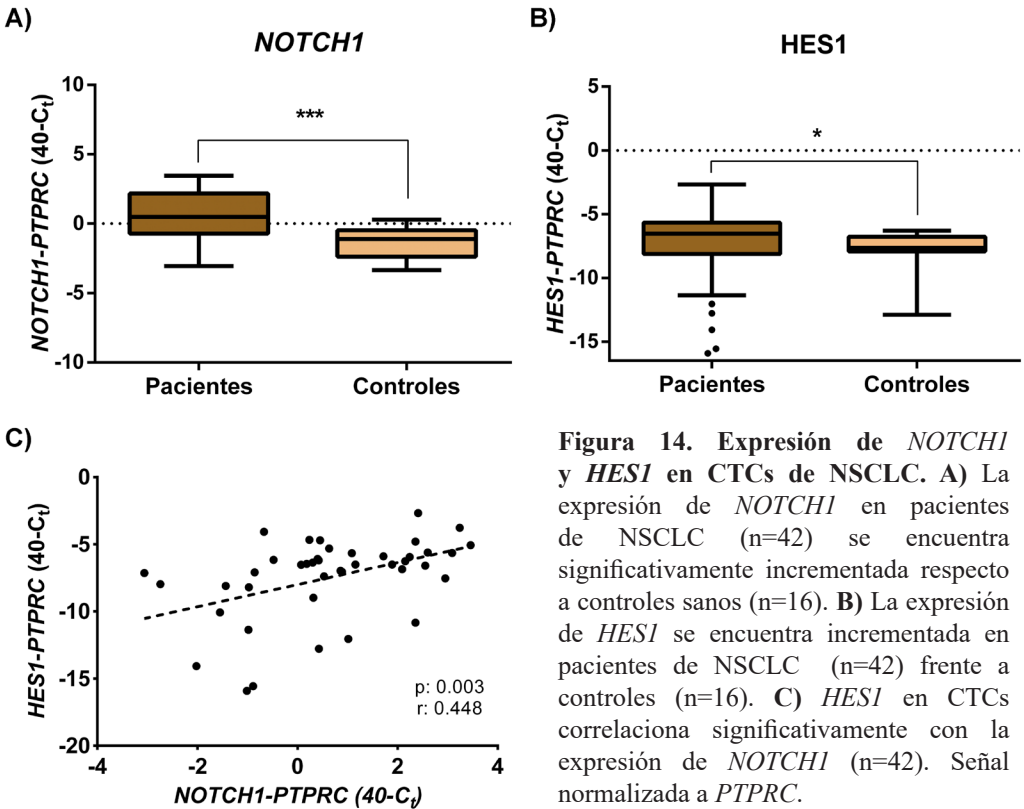


Figura 14. Expresión de *NOTCH1* y *HES1* en CTCs de NSCLC. **A)** La expresión de *NOTCH1* en pacientes de NSCLC (n=42) se encuentra significativamente incrementada respecto a controles sanos (n=16). **B)** La expresión de *HES1* se encuentra incrementada en pacientes de NSCLC (n=42) frente a controles (n=16). **C)** *HES1* en CTCs correlaciona significativamente con la expresión de *NOTCH1* (n=42). Señal normalizada a PTPRC.

7.1.4. Validación del *microarray* de expresión génica por RT-qPCR

Paralelamente a la evaluación de la función biológica de *NOTCH1* se procedió a la validación del perfil de expresión génica para CTCs EpCAM⁺ en pacientes con NSCLC avanzado. Para ello, se determinó la expresión para un número limitado de genes candidato incrementados significativamente en muestras de pacientes de NSCLC y vinculados a la red de *NOTCH1* por IPA. Los genes analizados fueron *LGALS3* (*Lectin Galactoside-Binding Soluble 3*), *ITGB3* (*Integrin beta 3*) y *PTP4A3* (*Protein tyrosine phosphatase type IVA 3*). El análisis de la señal por RT-qPCR confirma un incremento de expresión significativo para los genes seleccionados comparado en comparación con las muestras procedentes de controles sanos (Figuras 15A, 15B y 15C).

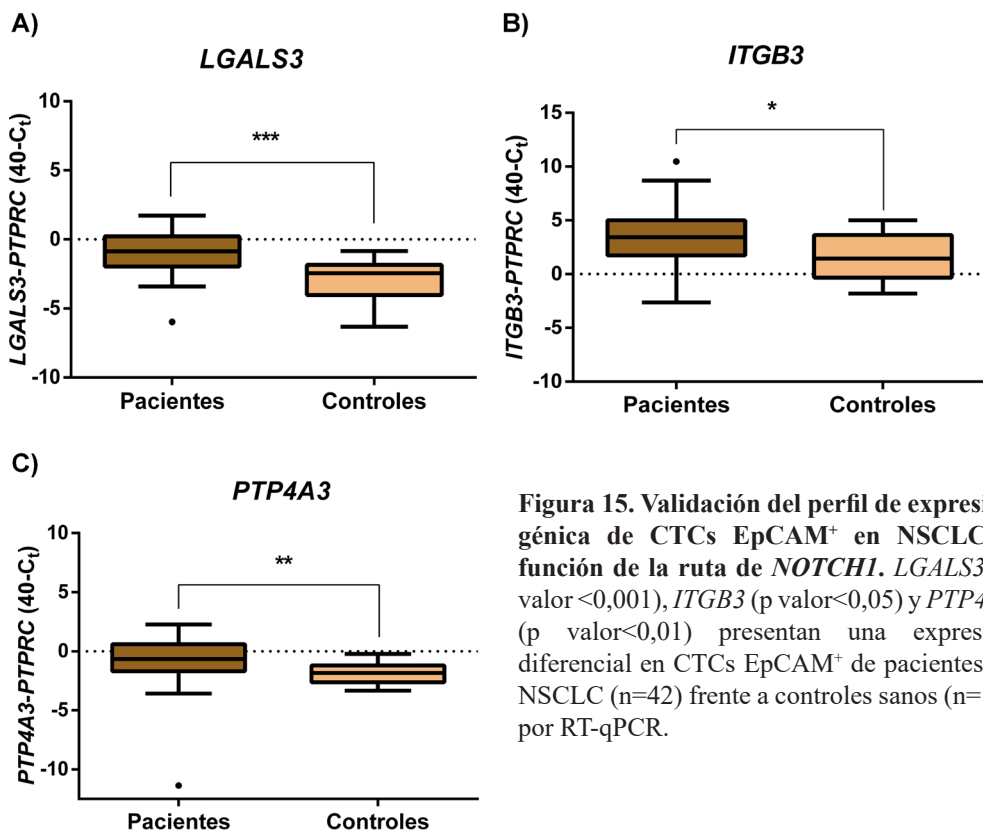


Figura 15. Validación del perfil de expresión génica de CTCs EpCAM⁺ en NSCLC y función de la ruta de *NOTCH1*. *LGALS3* (p valor < 0,001), *ITGB3* (p valor < 0,05) y *PTP4A3* (p valor < 0,01) presentan una expresión diferencial en CTCs EpCAM⁺ de pacientes de NSCLC (n=42) frente a controles sanos (n=16) por RT-qPCR.

7.2. La inhibición de Notch previene la proliferación en ausencia de sustrato

Con el fin de confirmar la influencia de la ruta de Notch en la supervivencia y proliferación de las CTCs que darán lugar a las metástasis se procedió a evaluar la capacidad de proliferar en ausencia de sustrato de la línea celular de adenocarcinoma A549 en presencia de un potente inhibidor de la ruta de Notch, el inhibidor de γ -secretasa DAPT.

El tratamiento con DAPT fue capaz de reducir de manera significativa la proliferación en ausencia de sustrato *in vitro* de estas células a distintas concentraciones demostrando la influencia de la ruta de Notch en la colonización celular (p valor=0,031; Figura 16).

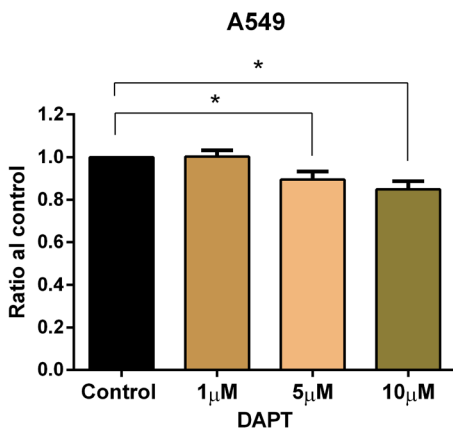


Figura 16. Inhibición de Notch en A549. El tratamiento con el inhibidor de Notch DAPT es capaz de disminuir significativamente la proliferación en ausencia de sustrato de la línea de cáncer de pulmón A549 ($n=6$).

7.3. Valor pronóstico de los biomarcadores validados

Con el objetivo de profundizar en la utilidad clínica de las CTCs inmu-noaisladas en pacientes con NSCLC avanzado, el perfil de expresión de CTCs nos proporcionó de una serie de potenciales marcadores para el diagnóstico y pronóstico clínico. Para ello, definimos un grupo de mal pronóstico para cada biomarcador dentro de nuestra cohorte de pacientes compuesto por el 33% de los pacientes ($n=14$) con la señal más alta por RT-qPCR para la relación *marker-PTPRC*.

El análisis de Cox univariante permitió identificar capacidad pronóstico para Supervivencia Libre de Progresión (PFS) en *NOTCH1* (p valor=0,034), *PTP4A3* (p valor=0,003), *LGALS3* (p valor =0,044) e *ITGB3* (p valor=0,046); del mismo modo para *ITGB3* y Supervivencia Global (OS) (p=0,006) (Tabla 11, panel superior). *GAPDH*, un marcador indirecto de la carga tumoral, presenta consecuentemente valor clínico en la predicción de PFS (p valor=0,001) y OS (p valor=0,001) (Tabla 11, panel superior).

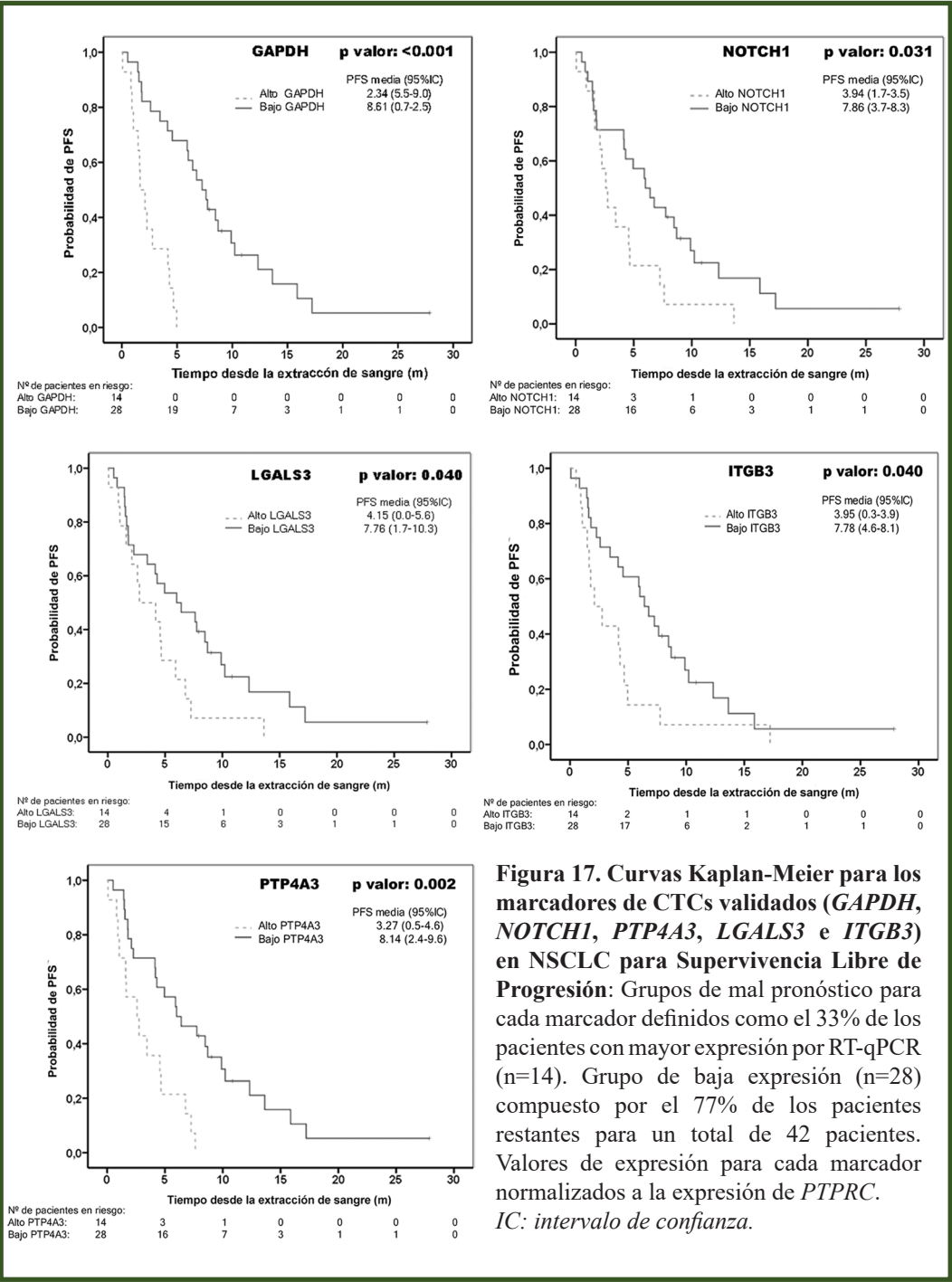
Del mismo modo, el contraste con algunas las variables clínicas más importantes nos permitió identificar la presencia de metástasis óseas como la única variable clínica con valor pronóstico dentro de nuestra corte de pacientes (p valor=0,014). La variable Estado Funcional (del inglés, *Performance Status*), considerada la variable clínica con mayor potencia pronóstica en cáncer de pulmón, muestra un valor cercano a la significación (p valor=0,055) para OS (Tabla 11, panel inferior).

Tabla 11. Análisis de Cox univariante para los marcadores de CTCs y parámetros clínico-patológicos

Análisis de Cox univariante	Sup. libre de progresión		Supervivencia global	
	RR (95% IC)	p valor	RR (95% IC)	p valor
<i>GAPDH</i> (mal vs. buen pronóstico)	5,71 (2,4-13,4)	<0,001	9,11 (3,5-23,9)	<0,001
<i>NOTCH1</i> (mal vs. buen pronóstico)	2,11 (1,0-4,2)	0,034	1,16 (0,6-2,4)	0,689
<i>PTP4A3</i> (mal vs. buen pronóstico)	3,10 (1,5-6,5)	0,003	1,45 (0,7-3,0)	0,305
<i>LGALS3</i> (mal vs. buen pronóstico)	2,03 (1,0-4,0)	0,044	1,60 (0,8-3,2)	0,193
<i>ITGB3</i> (mal vs. buen pronóstico)	2,02 (1,0-4,0)	0,046	2,74 (1,3-5,6)	0,006
Estado Funcional (PS2-3 vs. PS0-1)	1,67 (0,7-3,9)	0,236	1,56 (0,7-3,6)	0,055
Sexo (hombre vs. mujer)	1,11 (0,5-2,4)	0,792	1,08 (0,4-2,6)	0,863
Histología (escamoso vs. adenocarcinoma)	1,45 (0,7-3,0)	0,319	1,08 (0,5-2,4)	0,847
Estadio patológico (IIIA/IIIB vs. IV)	1,08 (0,4-2,6)	0,859	1,13 (0,4-2,9)	0,803
T (T3/T4 vs. T0/T1/T2)	1,52 (0,8-3,0)	0,234	1,00 (0,5-2,1)	0,990
N (N3 vs. N0/N1/N2)	1,72 (0,9-3,3)	0,101	1,37 (0,7-2,7)	0,364
Nº de metástasis (≥2 vs. <2)	1,37 (0,7-2,6)	0,359	1,78 (0,9-3,7)	0,118
Metástasis óseas (Sí vs. No)	2,39 (1,2-4,8)	0,014	1,82 (0,9-3,7)	0,096

HR: Riesgo Relativo; CI: Intervalo de confianza.

Asimismo, las curvas Kaplan-Meier confirman el valor pronóstico de *NOTCH1*, *PTP4A3*, *LGALS3*, *ITGB3* y *GAPDH* para PFS (Figura 17); y de *GAPDH* e *ITGB3* para OS (Figura S1. Material Supl. 8.6).



Finalmente, el análisis multivariante del panel de biomarcadores con la presencia de metástasis óseas -como única variable clínica con valor pronóstico en nuestra cohorte- otorga un valor pronóstico independiente de PFS para *GAPDH*, *NOTCH1* y *PTP4A3*; del mismo modo que *GAPDH* e *ITGB3* para OS (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis de Cox multivariante para los marcadores de CTCs y presencia de metástasis óseas

Análisis de Cox multivariante	Supervivencia libre de progresión		Supervivencia global	
	RR (95% IC)	p valor	RR (95% IC)	p valor
<i>GAPDH</i> <i>GAPDH</i> (mal vs. buen pronóstico) Metástasis ósea (Sí vs. No)	5,67 (2,1-15,6) 1,16 (0,5-2,7)	0,001 0,727	10,29(3,4-30,7) 0,74 (0,3-1,8)	<0,001 0,503
<i>NOTCH1</i> <i>NOTCH1</i> (mal vs. buen pronóstico) Metástasis ósea (Sí vs. No)	2,20 (1,1-4,4) 2,48 (1,2-5,0)	0,027 0,011	1,22 (0,6-2,5) 1,86 (0,9-3,7)	0,582 0,087
<i>PTP4A3</i> <i>PTP4A3</i> (mal vs. buen pronóstico) Metástasis ósea (Sí vs. No)	3,17 (1,5-6,7) 2,45 (1,2-4,9)	0,002 0,012	1,57 (0,8-3,2) 1,92 (0,9-3,9)	0,222 0,073
<i>LGALS3</i> <i>LGALS3</i> (mal vs. buen pronóstico) Metástasis ósea (Sí vs. No)	1,93 (0,9-3,9) 2,29 (1,1-4,6)	0,067 0,021	1,59 (0,8-3,2) 1,81 (0,9-3,7)	0,204 0,101
<i>ITGB3</i> <i>ITGB3</i> (mal vs. buen pronóstico) Metástasis ósea (Sí vs. No)	1,72 (0,8-3,5) 2,12 (1,0-4,3)	0,134 0,040	2,72 (1,3-5,6) 1,59 (0,8-3,3)	0,007 0,211

RR: Riesgo relativo; IC: Intervalo de confianza.

A raíz de estos resultados, se procedió a la realización de un análisis de regresión logística para el panel de biomarcadores con el fin de evaluar su valor clínico para progresión temprana (<4 meses) en NSCLC. La composición en el modelo de *GAPDH*, *PTP4A3* y *NOTCH1* presenta el mayor valor pronóstico dentro de nuestra cohorte de pacientes (AUROC= 0,772; Figura 18).

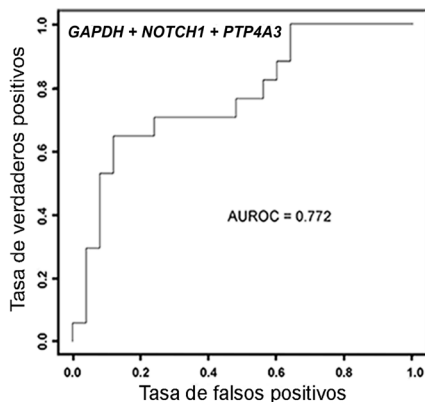


Figura 18. Modelo de regresión logística para los marcadores de CTCs en NSCLC. La combinación de *GAPDH*, *NOTCH1* y *PTP4A3* representa el mejor ajuste al modelo dentro de nuestra cohorte (n=42).

Adicionalmente, la definición de una variable compuesta por incremento de alguno de estos tres biomarcadores de CTCs incluidos en el modelo y con valor pronóstico independiente nos permite determinar su valor pronóstico para PFS y OS por Kaplan-Meier (Figura 19); del mismo modo que un análisis de Cox multivariante en combinación con la presencia de metástasis óseas identifica su valor pronóstico independiente para PFS y OS (Tabla 13).

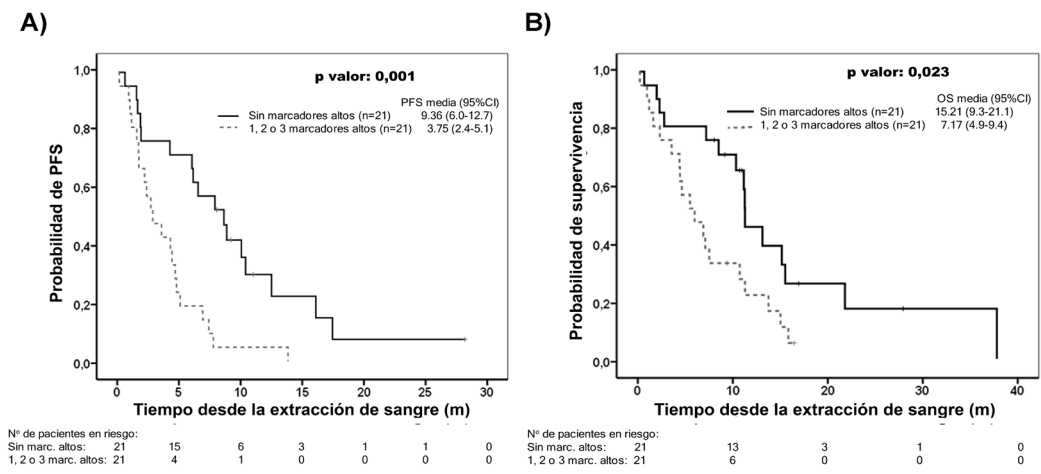


Figura 19. Curvas Kaplan-Meier para PFS y OS y la acumulación de biomarcadores de CTCs incluidos en el modelo de regresión logística. Variable construida en función de la presencia de algún biomarcador en el grupo de mal pronóstico. Grupo de mal pronóstico definido como el 33% de las expresiones más altas para cada biomarcador en la cohorte de 42 pacientes de NSCLC. **A)** Pacientes con algún marcador pronóstico elevado presentan una SFP significativamente menor. **B)** OS para aquellos pacientes con alguno de los marcadores de CTCs elevados es significativamente inferior a aquellos que no presentan valores de expresión en el grupo de mal pronóstico para alguno de los biomarcadores.

Tabla 13. Análisis de Cox multivariante para la acumulación de marcadores de CTCs y presencia de metástasis óseas

Análisis de Cox multivariante	Supervivencia libre de progresión		Supervivencia global	
	RR (95% IC)	p valor	RR (95% IC)	p valor
Acumulación de biomarcadores*				
Biomarc. de CTC (1,2 o 3 altos vs. ninguno)	3,06 (1,5-6,3)	0,002	2,33 (1,1-4,8)	0,022
Metástasis ósea (Sí vs. No)	2,22 (1,1-4,5)	0,028	1,91 (0,9-3,9)	0,077

*Acumulación para los biomarcadores de CTCs GAPDH, NOTCH1 y PTP4A3 definidos en el modelo de regresión logística y con valor pronóstico independiente. Expresión alta para cada marcador individual cuando incluida en el percentil 33 más alto para la cohorte de 42 pacientes de NSCLC. RR: Riesgo relativo; IC: Intervalo de confianza.

Capítulo 8.

Caracterización de exosomas de HEC-1A y H-ETV5 e influencia en el anidamiento tumoral al endotelio

8.1. Obtención de exosomas de cáncer de endometrio

Las vesículas extracelulares y su función han demostrado en los últimos años representar un abordaje prometedor en el estudio y manejo de distintas enfermedades. Actualmente el trabajo con exosomas está condicionado por una serie de limitaciones técnicas y de manejo que dificultan el establecimiento de una rutina de trabajo estándar. A esta situación se une a menudo una terminología confusa e imprecisa que dificulta la definición de las distintas subpoblaciones de EVs. Existen, sin embargo, unas directrices propuestas por la *Sociedad Internacional para las Vesículas Extracelulares* (ISEV) ampliamente aceptadas y que pretenden acotar el trabajo con vesículas extracelulares^{158,162}.

De acuerdo a estas directrices los exosomas fueron caracterizados desde tres aproximaciones distintas: 1) La observación directa por microscopia electrónica TEM de exosomas enteros. 2) La detección de determinadas proteínas referencia cuya presencia aparece enriquecida / disminuida en las preparaciones de exosomas. 3) La evaluación de rutina de la concentración y distribución de tamaño de los aislados de exosomas de acorde a unos parámetros establecidos.

El montaje de exosomas enteros para microscopía electrónica de transmisión nos permite confirmar la presencia de exosomas en los aislados obtenidos por ultracentrifugación diferencial (Figuras 20A y 20B). El tamaño y forma de los exosomas se encuentran dentro del rango de 50-120 nm esperado para preparados de exosomas.

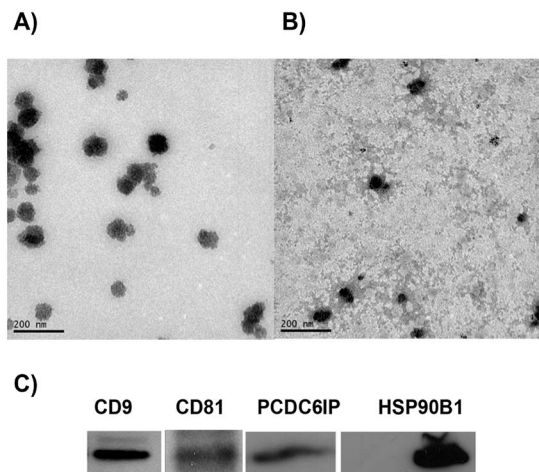


Figura 20. Caracterización de purificados de exosomas.

A) Exosomas procedentes de HEC-1A por TEM. **B)** Exosomas procedentes de medios condicionados con H-ETV5 por TEM. **C)** Detección de marcadores de exosomas en aislados de exosomas de HEC-1A. Detección de las tetraspaninas de membrana CD9 y CD81 y del marcador citosólico PCD6IP. HSP90B1, un control negativo de aislados de exosomas no se detecta en nuestras preparaciones mientras que sí somos capaces de detectar esta proteína en un control positivo de lisado celular.

La detección por *Western blot* de las tetraspaninas de membrana CD9 y CD81, y de la proteína citosólica PCD6IP en los aislados de exosomas de medios condicionados de HEC-1A nos permite confirmar el enriquecimiento en exosomas de nuestras muestras. Asimismo, la ausencia de HSP90B1 descarta la presencia de partículas asociadas a compartimentos distintos a la membrana plasmática o endosomal, lo cual nos permite contrastar el origen y pureza de los aislados (Figura 20C).

Una vez confirmada la naturaleza de los aislados se procedió a la determinación de rutina del perfil de tamaño y concentración de las muestras en un analizador *ZetaSizer* (Figura 21A). La elaboración de una recta patrón a partir de distintas diluciones de exosomas procedentes de líquido ascítico confirma la linealidad del número de cuentas detectadas (kcps) en una suspensión de exosomas bajo unas condiciones determinadas (Figura 21B). Asimismo, la naturaleza de los exosomas de líquido ascítico fue confirmada por de los marcadores CD9 y CD81 y una distribución de tamaño acorde a lo esperado (Figura 21C).

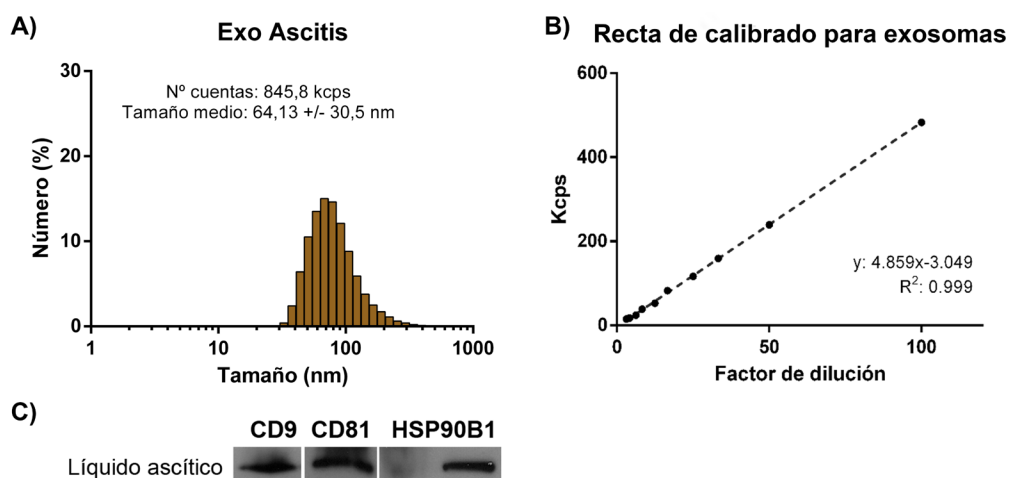


Figura 21. Caracterización de exosomas de líquido ascítico y recta patrón de exosomas en ZetaSizer. **A)** Diluciones seriadas para una preparación de exosomas procedentes de líquido ascítico. **B)** Distribución de tamaño de exosomas de purificados de exosomas procedentes de líquido ascítico por *ZetaSizer*. **C)** Detección de los marcadores de exosomas CD9 y CD81 en aislados de líquido ascítico. Ausencia del control negativo HSP90B1 junto a un control positivo procedente de un lisado celular.

El perfil de tamaño de las muestras de exosomas procedente de medios condicionados de líneas celulares muestra un enriquecimiento superior al 98% en partículas de un tamaño comprendido entre 50 y 120 nm (Figura 22); lo cual se corresponde con los tamaños esperados para muestras enriquecidas en exosomas y concuerda con el tamaño de los exosomas observados por TEM. Como es de esperar, los distintos solventes en los que se contuvieron las muestras (EBM-2 y EBM-2 + 2% FBS Exo-16h) no presentan enriquecimiento en partículas en ese rango de tamaño localizándose >99% de la población en un tamaño aproximado de 5 nm. Asimismo, el PBS, utilizado para diluir las alícuotas a medir por *ZetaSizer*, presenta una población homogénea de partículas en un rango <1 nm. Finalmente, un control de procesamiento de medio de cultivo sin condicionar (Exo Control negativo) no presenta enriquecimiento en el rango de tamaño de los exosomas certificando así la procedencia exclusiva de los exosomas a los medios condicionados.

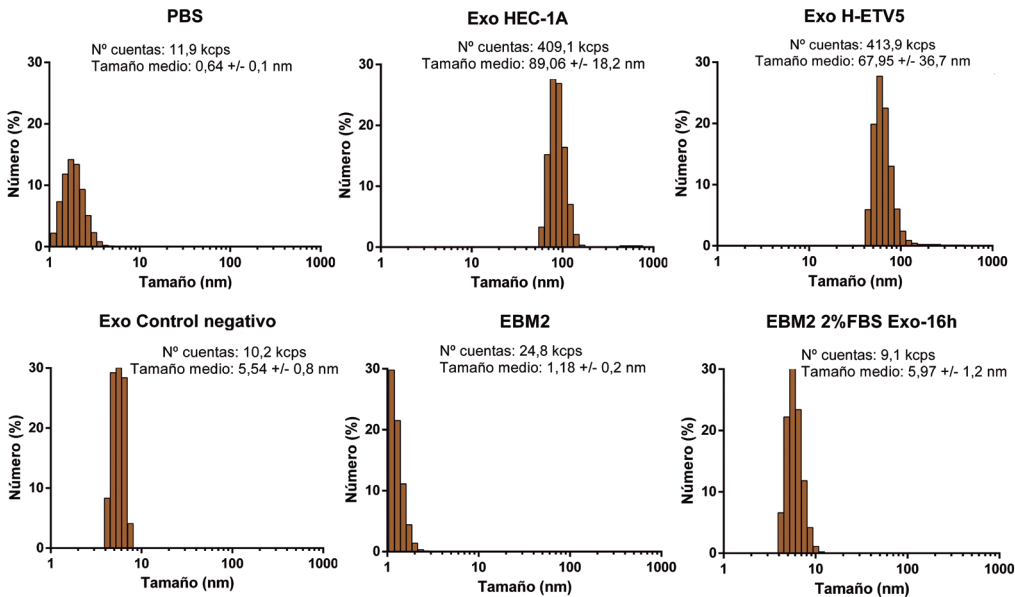


Figura 22. Distribución de tamaño de los aislados de exosomas de HEC-1A, H-ETV5 y los distintos medios de cultivo y vehículos utilizados. No se observa enriquecimiento en partículas de 100 nm en medios de cultivo sin ultracentrifugar ni en un control negativo de procesamiento.

Por último, y con el fin de acotar la ventana de trabajo para los aislados de exosomas se procedió a evaluar su estabilidad a lo largo del tiempo. La medida por *ZetaSizer* de la distribución de tamaño y número de cuentas para una misma muestra después de 48h a 4°C no mostró una alteración significativa (Figura 23).

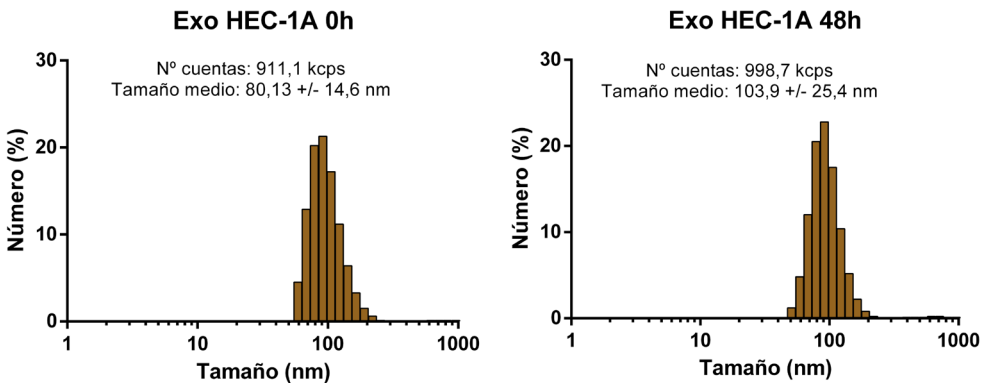


Figura 23. Estabilidad en el tiempo de los purificados de exosomas. La distribución de tamaño de los purificados de exosomas de HEC-1A no se ven significativamente alterados tras 48h a 4°C.

8.2. La sobreexpresión de ETV5 desencadena un proceso de EMT en HEC-1A

La sobreexpresión de ETV5 en HEC-1A es capaz de desencadenar un proceso de Transición Epitelio-Mesénquima (Figura 24A). La adquisición de un fenotipo mesenquimal fue confirmada mediante el análisis de la expresión de una serie de genes vinculados a EMT por RT-qPCR (Figura 24B). *SNAI1* (*Snail Family Zinc Finger 1*), *ZEB1* (*Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1*) y *ZEB2* (*Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2*) son factores de transcripción con capacidad de reprimir la expresión de la cadherina de origen epitelial (*E-cadherin*). Asimismo, *TGFB1* (*Transforming Growth Factor Beta 1*) y *GDF15* (*Growth Differentiation Factor 15*) implicados en procesos de proliferación, diferenciación, migración y adhesión aparecen frecuentemente sobreexpresados en procesos tumorales. Finalmente, la expresión de *ESR2* (*Estrogen Receptor 2*) aparece inhibida como consecuencia del proceso de EMT como ya ha sido reportado con anterioridad.

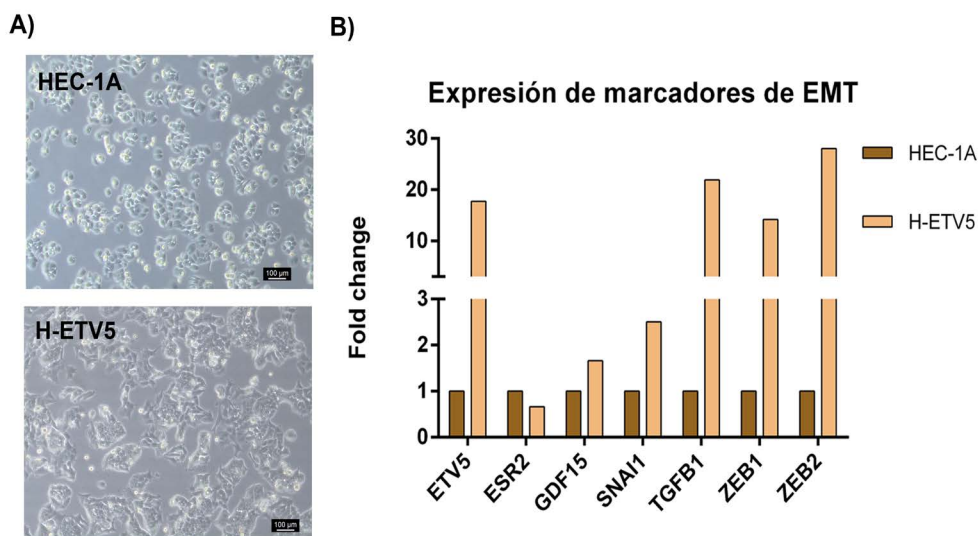


Figura 24. La sobreexpresión de ETV5 promueve EMT en HEC-1A. **A)** La sobreexpresión de ETV5 promueve la adquisición de un fenotipo mesenquimal derivado de EMT $\times 10$. **B)** El proceso de EMT promovido por ETV5 está mediado por la sobreexpresión de los promotores de EMT *TGFB1*, *ZEB1* y *ZEB2*.

8.3. Rendimiento de exosomas

Con el objetivo de estandarizar el flujo de trabajo de nuestro modelo de EMT (HEC-1A vs. H-ETV5) se procedió a determinar la variabilidad intra- e inter- muestral de los aislados de exosomas para ambas líneas. Considerando una tasa de proliferación igual para ambas líneas (22h), un perfil de tamaño de exosomas equivalente y estableciendo unas pautas de cultivo, procesamiento y evaluación fijas podemos determinar el rendimiento de exosomas por *ZetaSizer* a través de la relación entre el número de cuentas por unidad de volumen (kcps/ μ L) en los purificados de exosomas. El rendimiento de exosomas por extracción nos permite afirmar que no existen diferencias significativas en el rendimiento de exosomas para HEC-1A y H-ETV5 (p valor=0,187; Figura 25A); existiendo a su vez una correlación muy significativa para las muestras pareadas procedentes de una misma ronda de purificación (Figura 25B).

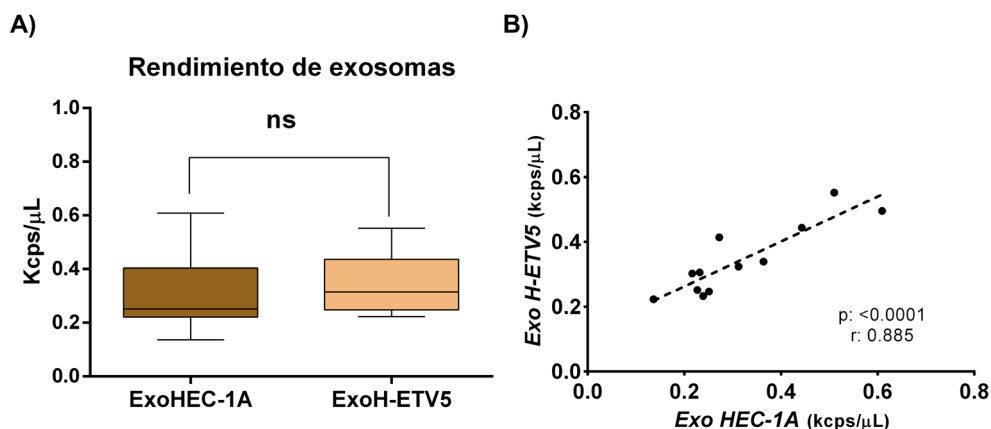


Figura 25. Rendimiento de exosomas para las líneas HEC-1A y H-ETV5. A) No existen diferencias significativas en el rendimiento de exosomas para HEC-1A y H-ETV5 ($n=12$). B) Análisis de correlación para las distintas purificaciones. Existe una correlación intermuestral muy significativa ($n=12$).

8.4. Caracterización proteómica de HEC-1A y H-ETV5: SILAC

Esta caracterización tiene como objeto determinar la influencia del proceso de EMT en el perfil proteómico de HEC-1A y a la vez que determinar de qué modo estos cambios participan en la capacidad de diseminación de la célula tumoral. La utilización de un modelo de EMT derivado de una misma línea celular -HEC-1A vs H-ETV5- nos permite a su vez uniformizar el fondo genético de la línea celular de origen por lo que las diferencias observadas serán atribuibles a la sobreexpresión de ETV5 y los factores de EMT estimulados por el mismo. Prestaremos especial atención a la fracción exosomal como elemento clave de la comunicación celular y partícipe del anidamiento e invasión tumoral. Adicionalmente distinguiremos entre aquellas proteínas secretadas en su forma libre al medio extracelular y aquellas que son encapsuladas previa a su liberación. En la Figura 26 aparece una representación esquematizada del flujo de trabajo utilizado para esta aproximación.

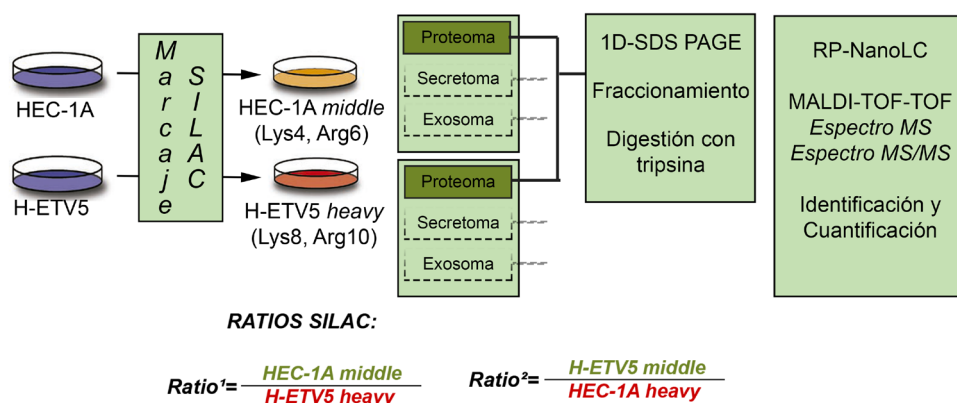


Figura 26. Flujo de trabajo utilizado para la caracterización proteica del proteoma, secretoma y exosoma de HEC-1A y H-ETV5. Proteoma, secretoma soluble y exosoma serán marcados de manera simultánea durante el cultivo celular. La línea tumoral HEC-1A será marcada con los isótopos de L-Lys y L-Arg *middle* mientras que H-ETV5 será marcada para los isótopos *heavy*. Los purificados proteicos para cada fracción celular serán entonces mezclados en un ratio 1:1 para su lanzamiento por LC MS/MS. La relación *middle* / *heavy* nos permitirá establecer una cuantificación relativa del contenido proteico. Adicionalmente, el *switch* del marcaje de exosomas nos permitirá además cuantificar el contenido proteico a través de la relación *heavy* / *middle*. 1D-SDS PAGE: Electroforésis en gel de poliacrilamida; RP-NanoLC: Cromatografía líquida de fase reversa; Espectro MS: Espectro de masas; Espectro MS/MS: Espectro de fragmentación.

8.4.1. Fase de adaptación

La realización de SILAC implica el uso de reactivos específicos en los que se ha realizado la depleción de los aminoácidos naturales L-Lys y L-Arg. Estos aminoácidos esenciales deberán ser añadidos de manera externa. Como refleja la Figura 27 la utilización de los reactivos específicos de SILAC no provocó alteración en las características fenotípicas y de proliferación.

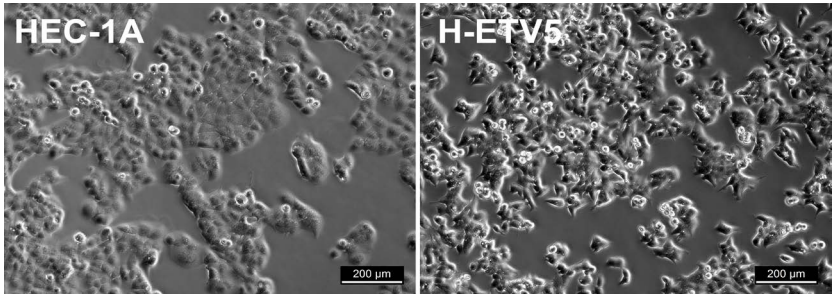


Figura 27. Características fenotípicas HEC-1A y H-ETV5 durante el marcaje SILAC. La utilización de reactivos SILAC no afecta a las características microscópicas de las células. La línea célula H-ETV5 mantiene un fenotipo mesenquimal derivado de EMT.

Paralelamente, el exceso de L-Lys y L-Arg fue previsto mediante el ajuste de la cantidad disponible de estos aminoácidos. La proliferación de ambas líneas a concentraciones decrecientes de estos aminoácidos determinó las concentraciones de 28 mg/L para L-Arg y 73 mg/L para L-Lys, una dilución 1/3 y 1/2 de las concentraciones originales, como concentraciones suficientes pero no excesivas para el marcaje de las líneas por SILAC (Figura 28).

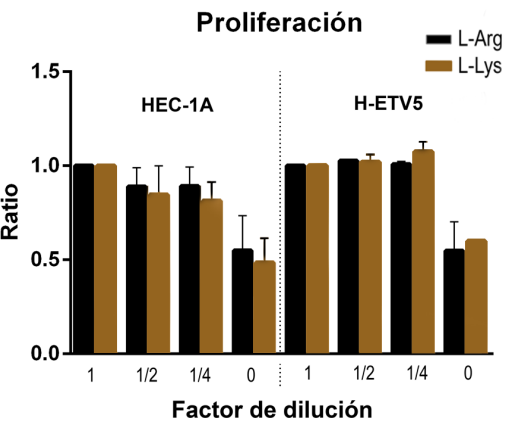


Figura 28. Proliferación de HEC-1A y H-ETV5 a concentraciones decrecientes de L-Arginina y L-Lisina. Concentraciones de partida standard para medios de cultivo de rutina L-Arg (84 mg/L) y L-Lys (148 mg/L).

8.4.2. Fase experimental

Una vez establecidas las condiciones de marcaje y acondicionadas las células a estas se procedió a la incorporación del marcaje metabólico mediante su incorporación al medio de cultivo. Se puede observar como ambas líneas proliferan con normalidad independientemente del marcaje incorporado (Figura 29A).

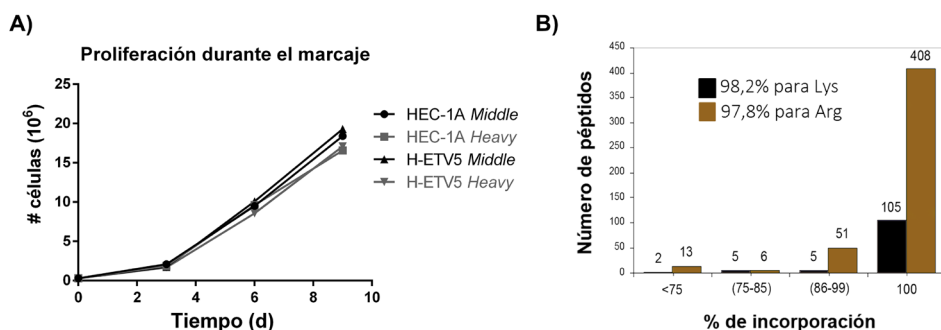


Figura 29. Marcaje para SILAC. A) HEC-1A y H-ETV5 proliferan con normalidad independientemente del marcaje incorporado. B) Transcurridos 8 ciclos de división la eficiencia del marcaje con L-Lys y L-Arg se aproxima a la uniformidad para una muestra de proteoma de HEC-1A.

Transcurridos 8 ciclos de división se tomó de una muestra del proteoma para la determinación de la eficiencia del marcaje por LC-MS. Los resultados nos permiten confirmar un marcaje aproximado del 98% para ambas líneas celulares (Figura 29B; no mostrado para H-ETV5). Hecho esto, se procedió a la obtención de las distintas fracciones de proteoma, secretoma soluble y exosoma para su análisis por LC-MS de acuerdo a los protocolos referidos.

8.4.3. Análisis de las muestras de proteoma, secretoma y exosoma

Extraídas las distintas fracciones se procedió a certificar su estado mediante su tinción con nitrato de plata (Figura 30). A continuación, se procedió a su análisis por LC-MS/MS de acuerdo a los protocolos especificados en el apartado M&M 5.3.4. En el caso de las muestras de exosomas se procedió adicionalmente al análisis conjunto de las fracciones procedentes de HEC-1A *heavy* / H-ETV5 *middle* (Figura 30, Gel C).

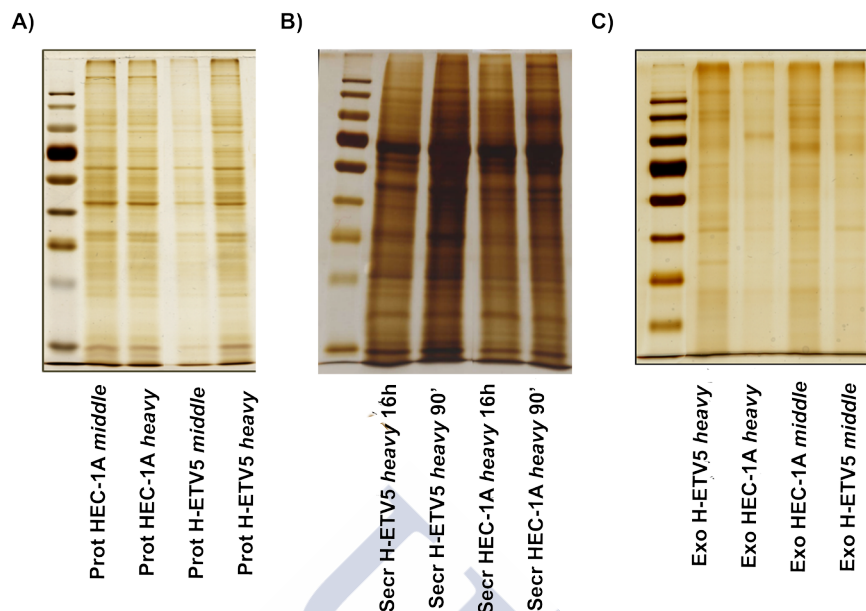


Figura 30. Geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata para las distintas fracciones de proteoma (A), secretoma soluble (B) y exosoma (C). No se observan diferencias en el perfil proteico de las muestras de secretoma con una depleción de vesículas extracelulares de 90' y aquellas deplecionadas de vesículas extracelulares durante 16 horas.

De acuerdo a lo referido en el apartado de M&M, previo a su lanzamiento, los secretomas solubles fueron deplecionados completamente de exosomas por ultracentrifugación durante 16h (100.000 g, 4°C) (M&M 5.3.3.3). Paralelamente se realizó una depleción de exosomas menos agresiva (90') en el caso de que la proteína del secretoma pudiera resultar alterada en una centrifugación tan intensa. En la Figura 30 (Gel B) podemos ver el perfil de proteína para las muestras *heavy* una vez deplecionados y concentrados los secretomas pudiendo concluir que los secretomas no se ven significativamente alterados durante el proceso de ultracentrifugación. Finalmente se procedió al lanzamiento y análisis de las distintas muestras de acuerdo a los criterios mencionados (M&M 5.3.4.).

8.4.3.1. *Proteínas moduladas para el proteoma*

Un análisis detallado por *FunRich* de las proteínas identificadas en el proteoma celular de ambas líneas (453 eventos. Tabla S9. Disponible en el CD adjunto) muestra un enriquecimiento en proteínas de localización citoplasmática (>60%) o nuclear (49%; no mostrado).

De entre las proteínas moduladas en el proteoma se encontraron 44 proteínas significativamente up-reguladas en H-ETV5 mientras que 34 resultaron significativamente moduladas en sentido opuesto (M&M 8.6. Tablas S1 y S2). De entre las proteínas significativamente moduladas en H-ETV5 encontramos proteínas vinculadas a procesos de glicolisis / gluconeogénesis además de la modulación positiva de DHRS2 -o Hep27- del mismo modo al identificado por Monge y colaboradores¹⁸⁹ con anterioridad. En este sentido, la modulación positiva de *DHRS2* ha demostrado una actividad protectora a la apoptosis inducida por estrés mediante la estabilización de p53/TP53. Consecuentemente, encontramos la modulación de distintos genes vinculados a respuesta a estrés (HS90AA1, HS90AB1, HSPA4, HSPD1, HSPA9, HSPA8). Finalmente, somos capaces de identificar también la presencia de distintas citoqueratinas (KRT18, KRT19, KRT7, KRT8) cuya expresión se encuentra incrementada en HEC-1A, algo en consonancia con su fenotipo.

8.4.3.2. Proteínas moduladas para el secretoma

El análisis de los secretomas deplecionados de exosomas permitió la identificación de 512 proteínas (Tabla S10. Disponible en el CD adjunto). Del total de identificaciones 166 de ellas fueron localizadas simultáneamente en el proteoma y en el secretoma (Figura 31A). Como es de esperar, de entre las proteínas identificadas exclusivamente en el proteoma y aquellas

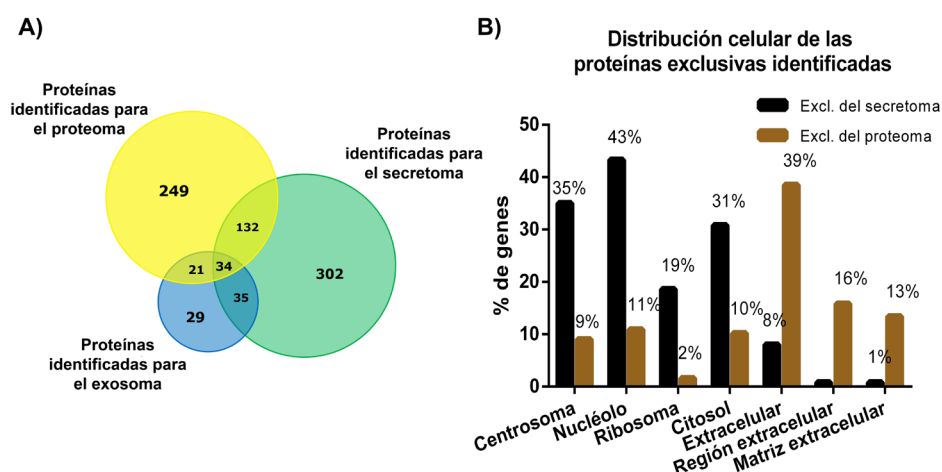


Figura 31. Perfil proteico del secretoma soluble de HEC-1A y H-ETV5 por SILAC.

A) Número de eventos identificados para cada una de las fracciones e identificaciones en común. B) Distribución celular de las proteínas identificadas de manera exclusiva en el proteoma o el secretoma.

exclusivas del secretoma encontramos un enriquecimiento en cuanto su distribución celular cuando analizado por *FunRich*. Mientras que las proteínas identificadas de manera exclusiva en el proteoma tienen un perfil preferentemente citoplasmático y nuclear, la fracción del secretoma muestra un enriquecimiento en proteínas de localización extracelular (Figura 31B).

Se identificaron 35 proteínas moduladas positivamente en H-ETV5 apareciendo únicamente 3 de ellas entre las moduladas en el proteoma (TPI1, TCP1 y AHCY). De entre las moduladas en el secretoma de HEC-1A se identificaron 76 proteínas significativamente up-reguladas en el secretoma, apareciendo únicamente FLNA entre las modulaciones del proteoma (M&M 8.6. Tablas S3 y S4). El análisis de las proteínas moduladas positivamente para H-ETV5 revela la presencia significativa de moléculas vinculadas a la red “*Cell death & Survival*” (p valor= $1,86 \times 10^{-2}$ – $2,67 \times 10^{-6}$; Figura 32A) en consonancia con las observaciones realizadas en el proteoma. Atendiendo a aquellas proteínas que aparecen moduladas para el secretoma de HEC-1A (M&M 8.6. Tabla S4), un análisis orientado a la búsqueda de rutas moleculares representadas destaca la señalización y remodelación de uniones adherentes a través de la ruta de ILK (*Integrin-linked kinase*; Figura 32B).

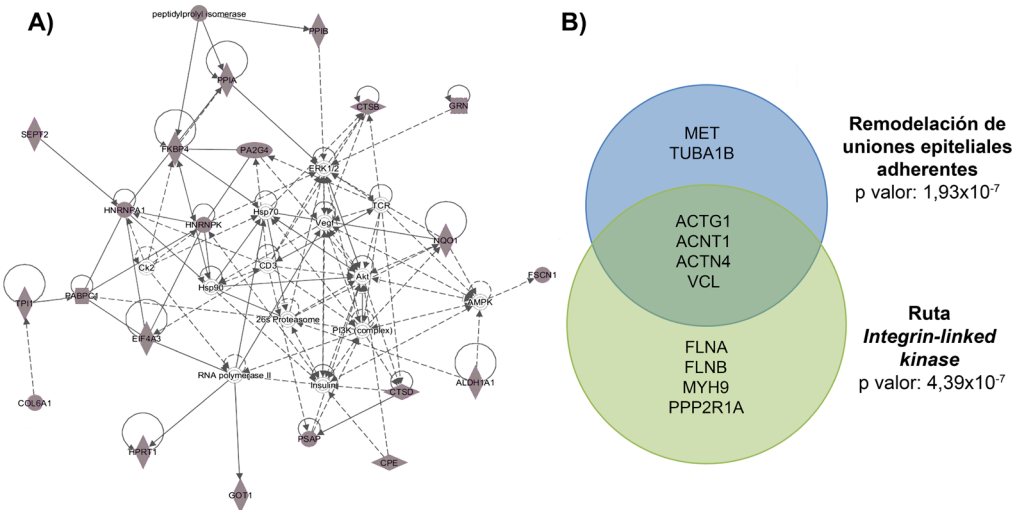


Figura 32. Proteínas moduladas positivamente en el secretoma. A) Red de interacción para la función *Cell death & Survival* de entre las proteínas moduladas positivamente en el secretoma de H-ETV5 por IPA. 21 moléculas implicadas en la red (28%). **B)** Funciones destacadas de entre las proteínas moduladas positivamente en el secretoma de HEC-1A por IPA.

8.4.3.3. *Proteínas moduladas para el exosoma*

Para el análisis de las proteínas moduladas en el exosoma se procedió adicionalmente a la realización de un *switch* del marcaje. Se analizaron por tanto 4 muestras: HEC-1A *middle*, HEC-1A *heavy*, H-ETV5 *middle* y H-ETV5 *heavy* (M&M. 5.3.1.).

El total de proteínas identificadas en las muestras de exosomas es de 119. De las cuales 56 de ellas identificadas en ambos marcajes de manera independiente, estando a su vez el 88.9% de ellas identificadas como proteínas de localización exosomal por *FunRich*. De entre el total de identificaciones (Tabla S11. Disponible en el CD adjunto), 16 proteínas se detectaron de manera conjunta en ambos marcajes de exosomas y ausentes en el secretoma (Tabla 14). Destaca la presencia en este grupo de tres tetraspáninas (CD9, CD63 y CD81) frecuentemente utilizadas como marcadores de membrana para preparaciones de exosomas; y de PCD6IP como marcador citosólico de exosomas. Encontramos también la presencia de EpCAM, el cual ha sido propuesto en ocasiones como marcador de vesículas extracelulares y como proteína a partir de la cual llevar a cabo el enriquecimiento de EVs en medios condicionados y líquidos biológicos de manera similar a como se viene realizando en el trabajo con CTCs. Coherentemente, dentro de estas identificaciones no aparece HSP90B1, el cual se utiliza como control negativo de aislados de exosomas y que sí aparece identificado en el proteoma.

Atendiendo a las proteínas encontradas moduladas se identificaron 10 proteínas up-reguladas en el exosoma de H-ETV5; de las cuales CLTC y CCT2 se identificaron también de entre las moduladas en el proteoma. No se identificaron modulaciones coincidentes entre el exosoma de H-ETV5 y su secretoma. Paralelamente se identificaron 21 proteínas como up-reguladas en el exosoma de HEC-1A (M&M 8.6. Tablas S5 y S6) habiendo sido ANXA1 identificada también como modulada en el proteoma. Adicionalmente, 13 de ellas se identificaron también como moduladas para el secretoma de HEC-1A (TNC, NID2, TINALGL1, LGALS3BP, HSPG2, VCAN, LAMA5, COL18A1, LAMC1, ACTG1, AGRN, TUBA1B y EZR).

Tabla 14. Proteínas identificadas por SILAC en ambas preparaciones de exosomas y ausentes en el secretoma

Símbolo	Nombre	Función	Detección en exosomas*	Observaciones
CD63	<i>CD63 antigen</i>	Migración. Transp. endosomal	CRC, mel, Prost	Marcador de exosomas
CD81	<i>CD81 antigen</i>	Modulación inmune. Proliferación.	CRC, Blad, mel, Prost, OV, Asc	Marcador de exosomas
CD9	<i>CD9 antigen</i>	Modulación inmune. Migración. Invasión.	CRC, Asc, mel, OV, Prost	Marcador de exosomas
EPCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>	Adhesión. Proliferación	CRC, Asc, OV, Prost	Marcador de exosomas
FTH1	<i>Ferritin heavy chain</i>	Transporte vesicular post-Golgi.	HCC, OV	
HIST1H2AA	<i>Histone H2A</i>	Estabilización del DNA	-	Marcador vesículas apoptóticas
ITGA3	<i>Integrin alpha-3</i>	Adhesión. Invasión	CRC, Blad, mel, OV, Prost	Interacciona con CD9, ITGB1
ITGB1	<i>Integrin beta-1</i>	Adhesión célula-célula y con la matriz extracelular. Migración. Proliferación.	CRC, HCC, mel, OV, Prost	
LYZ	<i>Lysozyme C</i>	Citólisis. Respuesta inflamatoria.	CRC	
MFGE8	<i>Lactadherin</i>	Adhesión. Angiogénesis. Fagocitosis	CRC, mel, HCC, Blad, OV, Prost	
MVP	<i>Major vault protein</i>	Proliferación.	CRC, HCC, mel, OV	
PCD6IP	<i>Programmed cell death 6-interacting protein</i>	Crecimiento tumoral	CRC, HCC, me, OV, Prost	Marcador de exosomas
PTGFRN	<i>Prostaglandin F2 receptor negative regulator</i>	Transporte trans-Golgi	CRC, HCC, mel, OV, Prost	Vinculada a CD9, CD63 y CD81
RPL6	<i>Ribosomal protein 60S</i>	Complejo ribosomal	CRC, HCC, mel	
SDCB1	<i>Syntenin-1</i>	Invasión	CRC, mel	Secreción de exosomas
SLC1A5	<i>Neutral amino acid transporter B (0)</i>	Transportador de amino-ácidos	CRC, mel, OV, Prost	

* Moléculas identificadas con anterioridad en exosomas tumorales de distinta naturaleza por ExoCarta. CRC: Cáncer colorrectal; mel: Melanoma; HCC: Carcinoma hepatocelular; Blad: Cáncer de vejiga; OV: Cáncer de ovario; Prost: Cáncer de próstata; Asc: Ascitis.

Un análisis funcional por IPA de las proteínas moduladas positivamente para H-ETV5 identifica las funciones “*Cell death & survival*” como la función más destacada (p valor= $4,60 \times 10^{-2}$ – $9,63 \times 10^{-5}$) en consonancia con el perfil obtenido para el proteoma y el secretoma. Finalmente, la búsqueda por IPA de rutas significativamente representadas entre las proteínas up-reguladas en HEC-1A nos remite a la función *Tissue & Cell morphology* (p valor= $1,05 \times 10^{-10}$ – $3,25 \times 10^{-4}$) aludiendo a una morfología anormal de la membrana basal y al movimiento e invasión tumoral (Tabla 15). Además, un análisis funcional por *GeneCodis3* permite identificar que más de la mitad de las modulaciones positivas para HEC-1A están directamente vinculadas a procesos de adhesión (p valor= $2,82 \times 10^{-9}$).

Tabla 15. Funciones incluidas en la red *Tissue & Cell Morphology* por IPA

Categoría	Función	Moléculas	p valor
Morfología y desarrollo tisular	Morfología anormal de la membrana basal	COL18A1, HSPG2, ITGA3, LAMC1, NID1	$1,05 \times 10^{-10}$
	Formación de la membrana basal	HSPG2, LAMB1, LAMC1, NID1	$7,77 \times 10^{-9}$
Movimiento y morfología celular	Movimiento de las células tumorales	COL18A1, EZR, ITGA3, LAMA5, TNC, VCAN	$5,32 \times 10^{-9}$
	Invasión celular	ANXA1, ANXA2, COL18A1, EZR, ITGA3, LAMA5, LAMC1, TNC, VCAN	$3,29 \times 10^{-7}$
	<i>Sprouting</i>	AGRN, ANXA2, COL18A1, EZR, HSPG2, ITGA3, TNC	$1,44 \times 10^{-7}$

De entre las proteínas identificadas como moduladas positivamente para el exosoma de HEC-1A se seleccionaron 7 de ellas para su validación por MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) en plasma en una cohorte de 85 pacientes de cáncer de endometrio. Adicionalmente, las tetraspaninas C9, CD63 y CD81; y EpCAM se incluyeron como marcadores de exosomas y normalizadores internos del contenido exosomal.

8.5. Influencia del exosoma en el anidamiento tumoral

8.5.1. Adhesión de las células tumorales a exosomas

El análisis proteico por SILAC de los exosomas diferencia entre un perfil adhesivo en los exosomas procedentes de HEC-1A frente a un perfil orientado a la supervivencia e invasión en los aislados de exosomas de H-ETV5.

La funcionalización en placa con exosomas nos permite observar cómo el exosoma es un reflejo del fenotipo de la célula de la que procede. El proceso de EMT en HEC-1A deriva en un fenotipo con una gran movilidad -H-ETV5- pero que por el contrario ve disminuida su capacidad de adhesión significativamente (p valor=0,031; Figura 33A). Asimismo, mientras que la funcionalización de una superficie de cultivo con exosomas de HEC-1A es capaz de favorecer la adhesión celular (p valor=0,031; Figura 33A). La funcionalización con exosomas de H-ETV5 no es capaz de incrementar su propia adhesión (p valor=0,562). Esta observación no es línea-específica, sino que la funcionalización con exosomas de HEC-1A es capaz de favorecer la adhesión de la línea poco adhesiva H-ETV5 (p valor= 0,031; Figura 33B). Por el contrario, la funcionalización con exosomas de H-ETV5 es capaz de disminuir la adhesión de la línea HEC-1A (p valor= 0,031; Figura 33B).

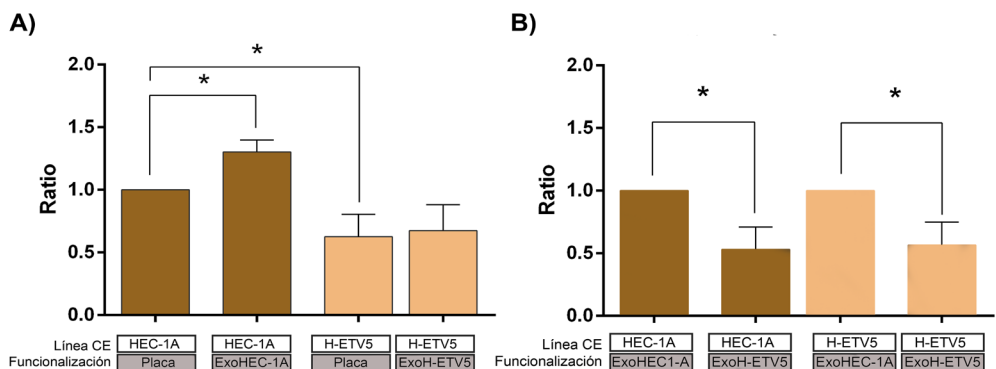


Figura 33. Efecto del exosoma en la adhesión de las células tumorales de CE. A) El proceso de EMT disminuye la capacidad de adhesión de HEC-1A (n=6). El exosoma de HEC-1A incrementa la adhesión de la célula tumoral (n=6). **B)** El exosoma de HEC-1A es capaz de incrementar la adhesión de la línea mesenquimal H-ETV5 (n=6).

8.5.2. Adhesión de las células tumorales a matriz extracelular

Dada la presencia de numerosas proteínas de matriz identificadas como moduladas positivamente en el exosoma de HEC-1A se procedió a evaluar la capacidad de adhesión de las células tumorales HEC-1A y H-ETV5 a distintos componentes de la matriz extracelular. Los resultados arrojan un incremento en la capacidad de la célula H-ETV5 de adherirse a dichos sustratos (Figura 34).

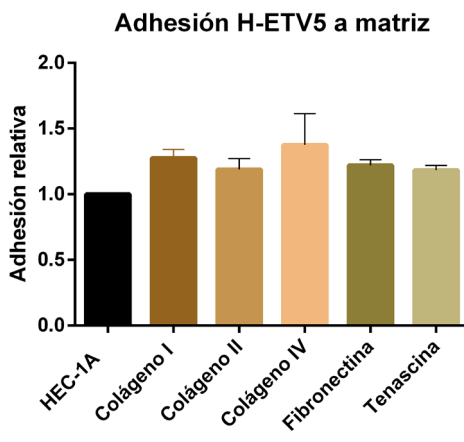


Figura 34. Adhesión de HEC-1A y H-ETV5 a componentes de la matriz. H-ETV5 presenta mayor capacidad de adhesión que HEC-1A a componentes de la matriz extracelular (n=2). Valores de adhesión normalizados a la adhesión de HEC-1A

8.5.3. Adhesión de las células tumorales a endotelio condicionado por exosomas

Una vez determinada la influencia de los exosomas en la capacidad de adhesión de las células tumorales a la superficie de cultivo se procedió a evaluar su influencia sobre monocapas de células endoteliales de la línea de cultivo EA.hy926 o células HUVEC de cultivo primario. El condicionamiento durante 8h de monocapas de células HUVEC con exosomas de HEC-1A produce un incremento significativo en la capacidad de adhesión de la línea celular H-ETV5 en monocapas de HUVEC (p valor=0,031). En el caso de monocapas de Ea.hy926 se observa una tendencia no llegándose a la significación (p valor=0,125; Figuras 35A y 35B).

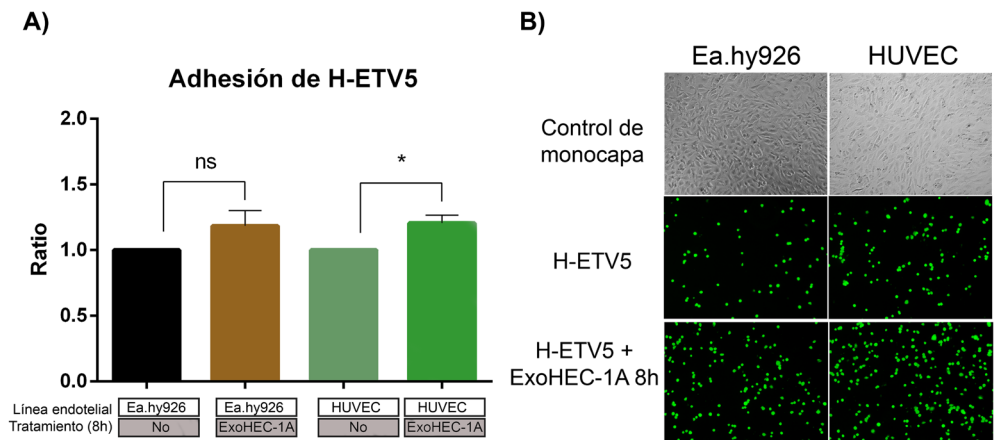


Figura 35. Adhesión de H-ETV5 a monocapas endoteliales. A) Adhesión de H-ETV5 a monocapas de células endoteliales Ea.hy926 (n=4) y HUVEC (n=6). B) Imagen representativa de la adhesión de las células tumorales H-ETV5 a monocapas de células endoteliales 10x.

8.5.4. Exosomas de HEC-1A estimulan la activación endotelial

La activación endotelial es un estado pro-inflamatorio y pro-coagulante que adquieren las células endoteliales recubriendo el lumen de los vasos sanguíneos. El tratamiento con exosomas de HEC-1A durante 8h es capaz de incrementar de manera significativa la expresión de SELE (p valor= 0,039) y VCAM1 (p valor= 0,008) (Figura 36). Este incremento ha sido confirmado por *Western blot* para VCAM1 (Figura 36, panel).

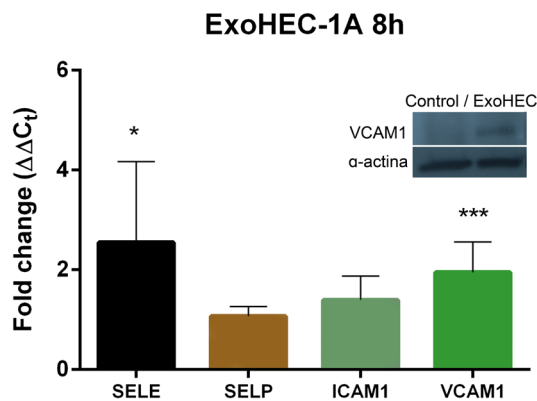


Figura 36. Activación de células endoteliales HUVEC por el tratamiento con exosomas. El tratamiento de monocapas HUVEC con exosomas de HEC-1A durante 8h es capaz de estimular la expresión de proteínas de activación por RT-qPCR (n=8).

8.6. Tablas suplementarias

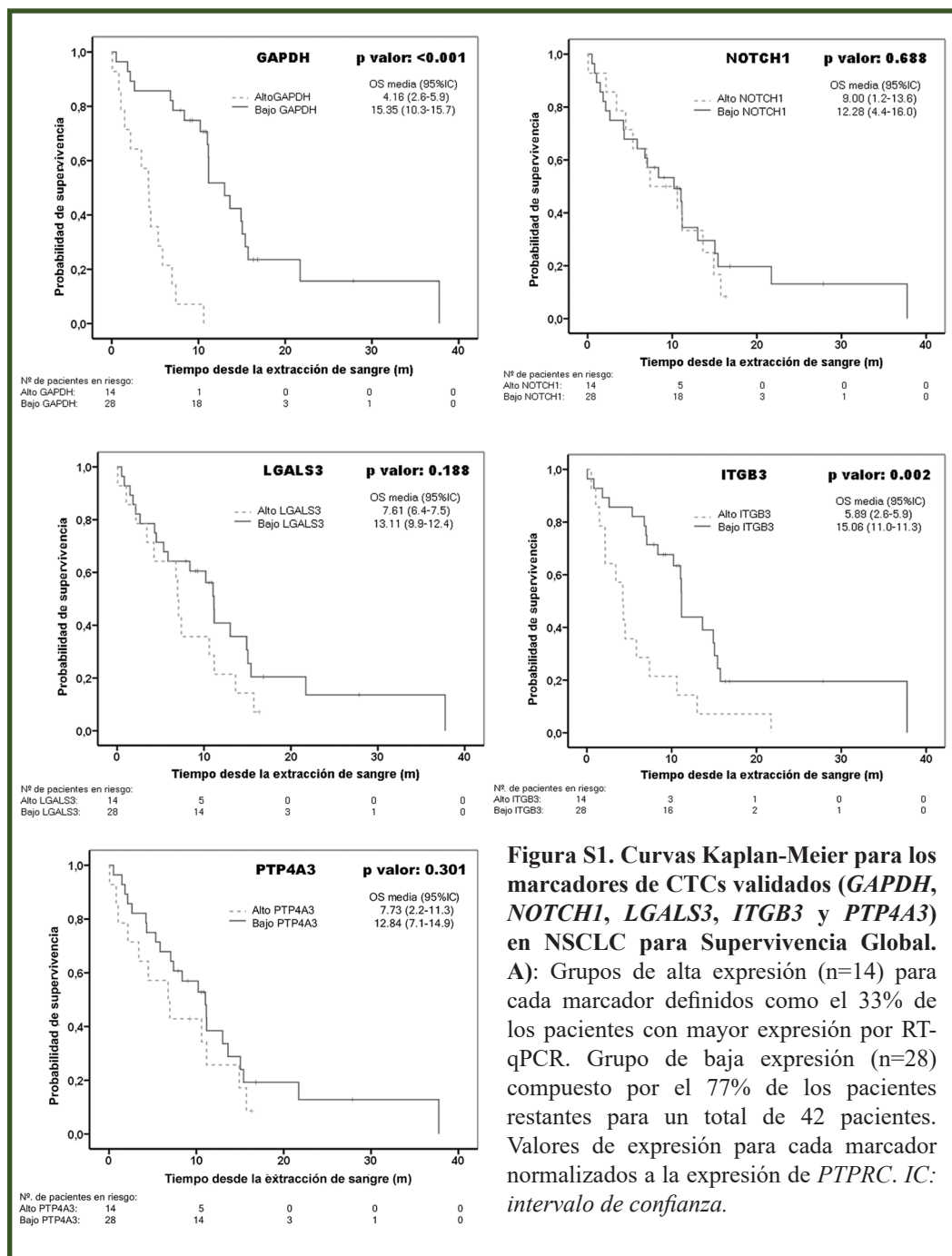


Figura S1. Curvas Kaplan-Meier para los marcadores de CTCs validados (*GAPDH*, *NOTCH1*, *LGALS3*, *ITGB3* y *PTP4A3*) en NSCLC para Supervivencia Global. A): Grupos de alta expresión (n=14) para cada marcador definidos como el 33% de los pacientes con mayor expresión por RT-qPCR. Grupo de baja expresión (n=28) compuesto por el 77% de los pacientes restantes para un total de 42 pacientes. Valores de expresión para cada marcador normalizados a la expresión de *PTPRC*. IC: intervalo de confianza.

Tabla S1. Proteínas significativamente moduladas para el proteoma de HEC-1A / H-ETV5 por SILAC

Proteínas más expresadas en el proteoma de H-ETV5 respecto a HEC-1A.

En negrita proteínas asociadas con anterioridad al metabolismo de H-ETV5

Símbolo *	Acceso *	% Cob **	Nombre	Nº Pép ***	HEC-1A : H-ETV5	p valor
LRPPRC	P42704	15,3	<i>Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial</i>	3	0,068	<0,05
IPO7	O95373	6,7	<i>Importin-7</i>	2	0,148	<0,01
DHRS2	Q13268	40,3	<i>Dehydrogenase/reductase SDR family member 2</i>	3	0,155	<0,01
PAICS	P22234	13,9	<i>Multifunctional protein ADE2</i>	2	0,206	<0,05
UBA1	P22314	32,1	<i>Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1</i>	9	0,215	<0,001
AHCY	P23526	17,4	<i>Adenosylhomocysteinase</i>	2	0,228	<0,01
FASN	P49327	29,2	<i>Fatty acid synthase</i>	17	0,246	<0,001
KPNB1	Q14974	9,4	<i>Importin subunit beta-1</i>	1	0,246	<0,05
CLTC	Q00610	30,2	<i>Clathrin heavy chain 1</i>	12	0,248	<0,001
MCM7	P33993	21,4	<i>DNA replication licensing factor MCM7</i>	4	0,248	<0,001
ACLY	P53396	18,4	<i>ATP-citrate synthase</i>	3	0,251	<0,05
CSE1L	P55060	17,6	<i>Exportin-2</i>	2	0,255	<0,05
EEF2	P13639	37,5	<i>Elongation factor 2</i>	11	0,260	<0,001
DHX9	Q08211	30,9	<i>ATP-dependent RNA helicase A</i>	12	0,261	<0,001
RNPEP	Q9H4A4	18,6	<i>Aminopeptidase B</i>	2	0,285	<0,01
SLC25A5	P05141	42,3	<i>ADP/ATP translocase 2</i>	8	0,301	<0,001
PPP2R1A	P30153	33,5	<i>Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A</i>	6	0,329	<0,001
HSP90AA1	P07900	36,5	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	19	0,346	<0,001
MYH9	P35579	22	<i>Myosin-9</i>	12	0,372	<0,001
HSPA4	P34932	18,7	<i>Heat shock 70 kDa protein 4</i>	3	0,419	<0,05
EEF1G	P26641	27,2	<i>Elongation factor 1-gamma</i>	4	0,436	<0,001
ACTN4	O43707	51	<i>Alpha-actinin-4</i>	21	0,464	<0,001
TKT	P29401	41,3	<i>Transketolase</i>	15	0,467	<0,01
HSP90AB1	P08238	43,9	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	19	0,513	<0,001
TUBA1B	P68363	53,7	<i>Tubulin alpha-1B chain</i>	20	0,513	<0,01
GPI	P06744	40,7	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>	6	0,523	<0,001
HNRNPM	P52272	21,4	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M</i>	3	0,527	<0,05
HSPA1A	P08107	35,1	<i>Heat shock 70 kDa protein 1A/1B</i>	11	0,538	<0,01
TUBB	P07437	66,2	<i>Tubulin beta chain</i>	29	0,555	<0,01
TCP1	P17987	16	<i>T-complex protein 1 subunit alpha</i>	3	0,555	<0,05
TPI1	P60174	72,7	<i>Triosephosphate isomerase</i>	10	0,609	<0,01
PRDX6	P30041	60,7	<i>Peroxiredoxin-6</i>	10	0,645	<0,05
RPS4X	P62701	36,9	<i>40S ribosomal protein S4, X isoform</i>	7	0,649	<0,001
SLC25A11	Q02978	33,1	<i>Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein</i>	4	0,655	<0,01
EIF4A1	P60842	48,3	<i>Eukaryotic initiation factor 4A-I</i>	10	0,660	<0,05
ILF2	Q12905	19,5	<i>Interleukin enhancer-binding factor 2</i>	2	0,661	<0,05
PKM	P14618	61,8	<i>Pyruvate kinase isozymes M1/M2</i>	22	0,663	<0,001
TUFM	P49411	23,5	<i>Elongation factor Tu, mitochondrial</i>	4	0,666	<0,05
RPLP0	P05388	31,6	<i>60S acidic ribosomal protein P0</i>	6	0,701	<0,05
PDIA6	Q15084	33,4	<i>Protein disulfide-isomerase A6</i>	4	0,718	<0,05
CCT2	P78371	25,8	<i>T-complex protein 1 subunit beta</i>	6	0,730	<0,05
HSPD1	P10809	62,7	<i>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	28	0,732	<0,01
HSPA9	P38646	28,6	<i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>	9	0,764	<0,05
NONO	Q15233	35,5	<i>Non-POU domain-containing octamer-binding protein</i>	2	0,817	<0,05

*Número de acceso y abreviatura para la base de datos Uniprot; ** Cobertura de secuencia; *** Péptidos identificados con más del 95% de confianza

Tabla S2. Proteínas significativamente moduladas para el proteoma de HEC-1A / H-ETV5 por SILAC

Proteínas más expresadas en el proteoma de HEC-1A respecto a H-ETV5

En negrita queratinas vinculadas al fenotipo celular epitelial de HEC-1A

Símbolo*	Acceso*	% Cob**	Nombre	N° Pép***	HEC-1A : H-ETV5	p valor
KRT7	P08729	60,3	Keratin, type II cytoskeletal 7	22	4,527	0
ISG15	P05161	31,5	Ubiquitin-like protein ISG15	3	4,506	<0,05
TPM4	P67936	24,2	Tropomyosin alpha-4 chain	3	3,295	<0,05
KRT19	P08727	70,3	Keratin, type I cytoskeletal 19	23	3,099	0
KRT18	P05783	81,6	Keratin, type I cytoskeletal 18	30	2,576	0
ANXA3	P12429	38,1	Annexin A3	3	2,544	<0,01
AHNAK	Q09666	20,6	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	9	2,439	<0,01
KRT8	P05787	59	Keratin, type II cytoskeletal 8	20	2,342	<0,001
LMNB1	P20700	42,8	Lamin-B1	11	2,083	0
G3BP1	Q13283	47,9	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	9	2,025	<0,001
PABPC1	P11940	41,7	Polyadenylate-binding protein 1	9	1,949	<0,001
LMNA	P02545	54,4	Prelamin-A/C	18	1,899	0
FLNA	P21333	18,1	Filamin-A	7	1,884	<0,05
DNM2	P50570	16,9	Dynamin-2	5	1,850	<0,01
NPM1	P06748	40,8	Nucleophosmin	8	1,839	<0,05
H2AFY	O75367	24,2	Core histone macro-H2A.1	5	1,771	<0,01
RPL35	P42766	18,7	60S ribosomal protein L35	3	1,749	<0,05
RPS10	P46783	35,2	40S ribosomal protein S10	4	1,725	<0,05
MYL6	P60660	52,3	Myosin light polypeptide 6	6	1,722	<0,05
TMPO	P42167	30,2	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma	3	1,566	<0,05
RBMX	P38159	28,4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	2	1,563	<0,01
NAP1L1	P55209	13,8	Nucleosome assembly protein 1-like 1	3	1,537	<0,05
SNRNP70	P08621	25,9	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa	4	1,457	<0,05
HNRNPA1	P09651	61,3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	14	1,422	<0,01
ANXA1	P04083	57,2	Annexin A1	12	1,420	<0,05
RPL7	P18124	46,4	60S ribosomal protein L7	6	1,404	<0,05
TAGLN2	P37802	51,3	Transgelin-2	6	1,395	<0,05
RPS8	P62241	41,8	40S ribosomal protein S8	7	1,394	<0,05
PDIA3	P30101	54,3	Protein disulfide-isomerase A3	11	1,388	<0,01
MDH2	P40926	52,1	Malate dehydrogenase, mitochondrial	9	1,354	<0,05
HNRNPK	P61978	57,7	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	14	1,346	<0,01
SYNCRIP	O60506	34,7	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	14	1,332	<0,05
GAPDH	P04406	61,5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	23	1,252	<0,05
EEF1A1P5	Q5VTE0	54,1	Putative elongation factor 1-alpha-like 3	20	1,186	<0,05

*Número de acceso y abreviatura para la base de datos Uniprot; ** Cobertura de secuencia; *** Péptidos identificados con más del 95% de homología

Tabla S3. Proteínas significativamente moduladas para el secretoma de HEC-1A / H-ETV5 por SILAC

Proteínas más expresadas en el secretoma de H-ETV5 respecto a HEC-1A

En negrita proteínas vinculadas a la red de “Cell death & Survival” por IPA

Símbolo*	Acceso*	% Cob**	Nombre	N° Pép***	HEC-1A : H-ETV5	p valor
ALDH1A1	P00352	44,5	Retinal dehydrogenase 1	7	0,065	<0,01
CA2	P00918	30,8	Carbonic anhydrase 2	3	0,202	<0,05
NQO1	P15559	33,9	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	3	0,329	<0,05
PSAP	P07602	46,6	Proactivator polypeptide	13	0,401	<0,01
TPI1	P60174	82,3	Triosephosphate isomerase	19	0,448	0
RCC1	P18754	24,2	Regulator of chromosome condensation	2	0,460	<0,05
GSS	P48637	53,6	Glutathione synthetase	12	0,463	0
PP1B	P23284	54,6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	8	0,475	<0,01
PA2G4	Q9UQ80	50,5	Proliferation-associated protein 2G4	11	0,481	<0,001
COL6A1	P12109	54,6	Collagen alpha-1(VI) chain	13	0,494	<0,001
HNRNPA1	P09651	42,2	eterogeneous nuclear ribonucleoprotein A	4	0,504	<0,01
GRN	P28799	31	Granulins	13	0,506	<0,001
CTSD	P07339	68,5	Cathepsin D	32	0,521	0
HNRNPK	P61978	52,7	teterogeneous nuclear ribonucleoprotein I	9	0,545	0
EEF1A1P5	Q5VTE0	72,1	Putative elongation factor 1-alpha-like 3	12	0,555	<0,01
FKBP4	Q02790	44,4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	6	0,565	<0,05
EIF4A3	P38919	37,7	Eukaryotic initiation factor 4A-III	5	0,566	<0,01
CPE	P16870	54,4	Carboxypeptidase E	9	0,577	<0,01
HPRT1	P00492	28	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	2	0,582	<0,05
PEBP1	P30086	43,3	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	2	0,596	<0,05
SGSH	P51688	35,9	N-sulphoglucosamine sulphohydrolase	4	0,598	<0,05
SEPT2	Q15019	44,6	Septin-2	3	0,608	<0,05
GOT1	P17174	28,8	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	5	0,624	<0,05
PABPC1	P11940	38,8	Polyadenylate-binding protein 1	1	0,641	<0,01
PPIA	P62937	76,4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	14	0,648	<0,01
CTSB	P07858	49,9	Cathepsin B	17	0,650	<0,001
RCC2	Q9P258	41,8	Protein RCC2	4	0,654	<0,05
CTSA	P10619	41,7	Lysosomal protective protein	10	0,657	<0,01
GNS	P15586	44	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	6	0,666	<0,001
TCP1	P17987	37,8	T-complex protein 1 subunit alpha	6	0,669	<0,05
GSR	P00390	39,3	Glutathione reductase, mitochondrial	6	0,670	<0,05
FSCN1	Q16658	41,2	Fascin	7	0,675	<0,001
NUCB1	Q02818	58,8	Nucleobindin-1	17	0,684	<0,001
AHCY	P23526	40,5	Adenosylhomocysteinase	9	0,687	<0,01
ENO1	P06733	92,9	Alpha-enolase	41	0,703	<0,001

*Número de acceso y abreviatura para la base de datos Uniprot; ** Cobertura de secuencia; *** Péptidos identificados con más del 95% de homología

Tabla S4. Proteínas significativamente moduladas para el secretoma de HEC-1A / H-ETV5 por SILAC. Parte 1 de 2.

Proteínas más expresadas en el secretoma de HEC-1A respecto a H-ETV5

En negrita proteínas vinculadas a la ruta ILK y/o remodelación de uniones adherentes

Símbolo*	Acceso*	% Cob**	Nombre	N° Pép***	HEC-1A : H-ETV5	p valor
PLAU	P00749	82,8	<i>Urokinase-type plasminogen activator</i>	28	99,230	0
TNC	P24821	52,3	<i>Tenascin</i>	57	45,834	0
PIGR	P01833	41,1	<i>Polymeric immunoglobulin receptor</i>	8	42,250	<0,01
PRSS22	Q9GZN4	27,1	<i>Brain-specific serine protease 4</i>	3	11,235	<0,05
NID2	Q14112	37	<i>Nidogen-2</i>	15	11,170	0
TINAGL1	Q9GZM7	42,8	<i>Tubulointerstitial nephritis antigen-like</i>	8	10,097	0
AXL	P30530	27,5	<i>Tyrosine-protein kinase receptor UFO</i>	9	9,465	<0,001
LAMB3	Q13751	50,6	<i>Laminin subunit beta-3</i>	16	7,638	0
PROS1	P07225	34,2	<i>Vitamin K-dependent protein S</i>	10	6,266	0
ADAM10	O14672	47,9	<i>Disintegrin and metalloproteinase 10</i>	11	5,797	<0,05
LGALS3BP	Q08380	46,7	<i>Galectin-3-binding protein</i>	21	5,643	0
SORL1	Q92673	31,1	<i>Sortilin-related receptor</i>	11	5,462	0
HSPG2	P98160	37,1	<i>Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein</i>	24	5,455	<0,001
FLNA	P21333	43,7	Filamin-A	24	5,145	0
MET	P08581	35,7	Hepatocyte growth factor receptor	16	5,088	0
CLTC	Q00610	34,9	<i>Clathrin heavy chain 1</i>	9	4,970	0
ACLY	P53396	33,2	<i>ATP-citrate synthase</i>	2	4,410	<0,05
PCSK5	Q92824	35,2	<i>Proprotein convertase subtilisin/kexin type 5</i>	9	4,344	<0,001
SPINT1	O43278	27,2	<i>Kunitz-type protease inhibitor 1</i>	6	3,878	0
VCAN	P13611	26	<i>Versican core protein</i>	18	3,459	0
LAMA5	O15230	36,2	<i>Laminin subunit alpha-5</i>	10	3,397	0
OL18A1	P39060	47,8	<i>Collagen alpha-1(XVIII) chain</i>	24	3,390	<0,01
PCSK9	Q8NBP7	56,4	<i>Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9</i>	24	3,370	0
LAMC2	Q13753	43,5	<i>Laminin subunit gamma-2</i>	13	3,324	0
LAMC1	P11047	43,1	<i>Laminin subunit gamma-1</i>	15	3,266	0
STC2	O76061	71,5	<i>Stanniocalcin-2</i>	11	3,243	0
ACTG1	P63261	86,4	Actin, cytoplasmic 2	42	3,162	0
MAN2A1	Q16706	38,8	<i>Alpha-mannosidase 2</i>	12	3,145	0
LDLR	P01130	35,7	<i>Low-density lipoprotein receptor</i>	6	3,097	0
COL12A1	Q99715	26,8	<i>Collagen alpha-1(XII) chain</i>	2	3,038	<0,01
RTN4R	Q9BZR6	25,8	<i>Reticulon-4 receptor</i>	3	2,987	<0,05
FLNB	O75369	45,3	Filamin-B	20	2,946	0
SEMA4B	Q9NPR2	35,2	<i>Semaphorin-4B</i>	4	2,773	<0,05
HLA-C	P04222	36,1	<i>HLA class I histocompatibility antigen</i>	6	2,642	<0,05
DPP4	P27487	32,5	<i>Dipeptidyl peptidase 4</i>	7	2,611	<0,001
AGRN	O00468	56,6	<i>Agrin</i>	99	2,587	0
APP	P05067	63,4	<i>Amyloid beta A4 protein</i>	51	2,529	0
CLSTN1	O94985	45,1	<i>Calsyntenin-1</i>	49	2,456	0
YWHAZ	P63104	38,8	<i>14-3-3 protein zeta/delta</i>	7	2,365	<0,05
LMAN2	Q12907	55,1	<i>Vesicular integral-membrane protein VIP36</i>	9	2,275	<0,01
IPO7	O95373	15	<i>Importin-7</i>	3	2,245	<0,05
NAGLU	P54802	31,1	<i>Alpha-N-acetylglucosaminidase</i>	8	2,231	0
SERPINI1	Q99574	27,3	<i>Neuroserpin</i>	5	2,119	<0,01
MYH9	P35579	42	Myosin-9	10	2,063	<0,01
GDF15	Q99988	41,9	<i>Growth/differentiation factor 15</i>	4	2,033	<0,05
ACTN1	P12814	60,1	Alpha-actinin-1	34	2,017	0
TUBA1B	P68363	51,7	Tubulin alpha-1B chain	9	2,004	<0,01
APLP2	Q06481	36,8	<i>Amyloid-like protein 2</i>	15	2,004	<0,001
ACTN4	O43707	75,7	Alpha-actinin-4	55	1,964	0

*Número de acceso y abreviatura para la base de datos Uniprot; ** Cobertura de secuencia; *** Péptidos identificados con más del 95% de homología

Tabla S4 continuación. Proteínas significativamente moduladas para el secretoma de HEC-1A / H-ETV5 por SILAC. Parte 2 de 2.**Proteínas más expresadas en el secretoma de HEC-1A respecto a H-ETV5***En negrita proteínas vinculadas a la ruta ILK y/o remodelación de uniones adherentes*

Símbolo*	Acceso*	% Cob**	Nombre	N° Pép***	HEC-1A : H-ETV5	p valor
HEXA	P06865	38,4	Beta-hexosaminidase subunit alpha	6	1,875	<0,05
PTPRF	P10586	39,5	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F	9	1,865	0
NPEPPS	P55786	28,7	Puromycin-sensitive aminopeptidase	5	1,861	<0,05
TARS	P26639	21,6	Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	2	1,847	<0,01
CTSZ	Q9UBR2	46,5	Cathepsin Z	3	1,847	<0,05
HSPA4	P34932	40,7	Heat shock 70 kDa protein 4	10	1,832	<0,01
PPP2R1A	P30153	30,9	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha	4	1,830	<0,01
GLB1	P16278	41,8	Beta-galactosidase	12	1,749	<0,05
FDP5	P14324	7,6	Farnesyl pyrophosphate synthase	2	1,726	<0,05
ALCAM	Q13740	47,3	CD166 antigen	13	1,701	<0,001
PKM	P14618	80,6	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	46	1,678	0
RNH1	P13489	38,8	Ribonuclease inhibitor	3	1,677	<0,05
GGH	Q92820	51,9	Gamma-glutamyl hydrolase	10	1,644	<0,01
LSR	Q86X29	34,5	Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor	5	1,573	<0,01
VCL	P18206	56,1	Vinculin	13	1,531	<0,001
EZR	P15311	58,7	Ezrin	12	1,507	<0,01
BCAM	P50895	29,3	Basal cell adhesion molecule	4	1,497	<0,05
DSG2	Q14126	44,7	Desmoglein-2	14	1,482	0
NEU1	Q99519	32,5	Sialidase-1	6	1,478	<0,05
LDHA	P00338	41	L-lactate dehydrogenase A chain	8	1,445	<0,05
UBA1	P22314	43,8	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	13	1,414	<0,01
TIMP1	P01033	61,4	Metalloproteinase inhibitor 1	16	1,373	<0,05
PLOD3	O60568	24,4	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	4	1,358	<0,01
HSP90AB1	P08238	67,3	Heat shock protein HSP 90-beta	30	1,355	<0,05
SPTAN1	Q13813	42	Spectrin alpha chain, brain	19	1,344	<0,05
FUCA2	Q9BTY2	37	Plasma alpha-L-fucosidase	12	1,318	<0,01
TXNRD1	Q16881	48,2	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	10	1,318	<0,01

*Número de acceso y abreviatura para la base de datos Uniprot; ** Cobertura de secuencia; *** Péptidos identificados con más del 95% de homología

Tabla S5. Proteínas significativamente moduladas para el exosoma de HEC-1A / H-ETV5 por SILAC**Proteínas más expresadas en el exosoma de H-ETV5 respecto a HEC-1A**

Símbolo*	Acceso*	% Cob**	Nombre	N° Pép***	HEC-1A : H-ETV5	p valor
CLTC	Q00610	23,4	Clathrin heavy chain 1	14	0,437	0
HIST4H4	P62805	29,1	Histone H4	4	0,446	<0,05
MFGE8	Q08431	46,3	Lactadherin	4	0,507	<0,01
GAPDH	P04406	32,5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	5	0,755	<0,05
HSPA8	P11142	26,2 / 31,2 ⁺	Heat shock cognate 71 kDa protein	4 / 4 ⁺	0,806 / 0,771 ⁺	<0,05
FTH1	P02794	31,2	Ferritin heavy chain	3	0,168	<0,05
RPS5	P46782	25,5	40S ribosomal protein S5	2	0,315	<0,05
NID1	P14543	39,4	Nidogen-1	24	0,320	0
COL4A2	P08572	27,5	Collagen alpha-2(IV) chain	8	0,481	<0,05
CCT2	P78371	31,2	T-complex protein 1 subunit beta	4	0,639	<0,05

*Número de acceso y abreviatura para la base de datos Uniprot; ** Cobertura de secuencia; *** Péptidos identificados con más del 95% de confianza

+ Identificada en ambos marcapjes

Tabla S6. Proteínas significativamente moduladas para el exosoma de HEC-1A / H-ETV5 por SILAC**Proteínas más expresadas en el exosoma de HEC-1A respecto a H-ETV5**

Símbolo*	Acceso*	% Cob**	Nombre	N° Pép***	HEC-1A : H-ETV5	p valor
TNC	P24821	20,4	Tenascin	13	32,755	0
LAMC1	P11047	16,8	Laminin subunit gamma-1	6	6,937	<0,01
ANXA1	P04083	37,6	Annexin A1	4	5,723	<0,05
COL18A1	P39060	26,2 / 27,1 ⁺	Collagen alpha-1(XVIII) chain	15 / 17	5,483 / 1,379 ⁺	<0,001
LAMA5	O15230	30,1 / 30,9 ⁺	Laminin subunit alpha-5	36 / 24	4,813 / 1,206 ⁺	<0,001
LAMB1	P07942	10,0	Laminin subunit beta-1	2	4,691	<0,05
HSPG2	P98160	30,9	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan	48	3,773 / 2,380 ⁺	0
LGALS3BP	Q08380	48,2 / 42,9 ⁺	Galectin-3-binding protein	27 / 19	3,732 / 2,198 ⁺	0
NID2	Q14112	17,7	Nidogen-2	9	3,424	<0,001
TINAGL1	Q9GZM7	43,3 / 32,1 ⁺	Tubulointerstitial nephritis antigen-like	9 / 6	3,414 / 3,116 ⁺	<0,001
ANXA2	P07355	35,1 / 34,2 ⁺	Annexin A2	4 / 7 ⁺	3,184 / 1,554 ⁺	<0,001
VCAN	P13611	5,9	Versican core protein	5	3,133 / 1,859 ⁺	<0,01
AGRN	O00468	38,2	Agrin	32	3,087	<0,01
HIST4H4	P62805	58,3	Histone H4	10	2,075	0
EZR	P15311	18,1	Ezrin	2	2,058	<0,05
HIST1H2BC	P62807	78,6	Histone H2B type 1-C/E/F/G/I	11	1,935	<0,05
ITGA3	P26006	15,3	Integrin alpha-3	2	1,471	<0,05
TUBA1B	P68363	29,9	Tubulin alpha-1B chain	5	1,450	<0,05
TUBB	P07437	33,8	Tubulin beta chain	7	1,390	<0,01
ACTG1	P63261	62,9	Actin, cytoplasmic 2	12	1,370	<0,01
NID1	P14543	19,8	Nidogen-1	6	1,222	<0,05
CCT2	P78371	31,2	T-complex protein 1 subunit beta	4	0,639	<0,05

*Número de acceso y abreviatura para la base de datos Uniprot; ** Cobertura de secuencia; *** Péptidos identificados con más del 95% de confianza

+ Identificada en ambos marcajes



DISCUSIÓN





Capítulo 9. Discusión

La aparición de enfermedad diseminada en oncología representa el evento adverso de mayor relevancia en el pronóstico clínico. Mientras que aquellos tumores que son detectados en estadios no diseminados presentan un pronóstico clínico moderadamente favorable y accesible a la resección, son aquellos tumores con una diagnosis tardía los que presentan un peor pronóstico. Es por ello, que la metástasis representa un reto clínico de primera envergadura y un conocimiento detallado de sus mecanismos moleculares y celulares promete abrir una nueva era en la medicina oncológica.

La metástasis representa un evento complejo e influido por multitud de factores, y no es sino en los últimos años cuando estamos siendo verdaderamente conscientes de la complejidad del mismo. Paralelamente, el desarrollo de nuevas tecnologías permite un abordaje cada vez más exhaustivo de la diseminación tumoral y abre nuevas ventanas para la intervención terapéutica. Mejoras en las técnicas de imagen permiten la detección de lesiones oligometastásicas mientras que la incorporación de técnicas quirúrgicas y radiológicas asistidas permiten el tratamiento de pacientes otrora no operables -véase VATS *Video Assisted Thoracic Surgery* o SBRT *Stereotactic Body Radio Therapy* en el manejo de enfermedad metastásica^{-190,191}. Del mismo modo, un incremento en la especificidad y sensibilidad del equipamiento disponible en el diagnóstico en soporte líquido abre nuevas fronteras en el manejo oncológico^{95,99}.

Actualmente, la biopsia de tejido permanece como referencia en la decisión clínica de NSCLC. Sin embargo, estas biopsias pueden resultar incómodas, invasivas y pueden no identificar de manera relevante alteraciones moleculares -debido a una adquisición subóptima o heterogeneidad tumoral-. Las plataformas de diagnóstico líquido tienen el potencial de salvaguardar muchas de estas

limitaciones permitiendo una identificación rápida y precisa de mutaciones -*de novo* o de recurrencia-, la monitorización en tiempo real de la respuesta a tratamiento o la detección de enfermedad residual o de recurrencia.

Complementariamente, la investigación en Células TumORAles Circulantes (CTC) ha incrementado su interés clínico en los últimos años por su implicación directa en la diseminación tumoral. El aislamiento de CTCs a partir de una muestra de sangre periférica de un paciente con enfermedad diseminada no sólo permite una monitorización clínica, sino también una oportunidad para profundizar en la biología de esta población celular y el desarrollo de terapias dirigidas¹⁹². La captura de esta subpoblación de células en circulación hace de las CTCs una suerte de "fase líquida" de la progresión tumoral, la cual permite tener acceso a células tumorales sin necesidad de acceder directamente al tejido tumoral¹⁹³. Adicionalmente, el torrente sanguíneo representa un medio hostil en el que la progresión tumoral sufre un cuello de botella, otorgando así la oportunidad de un impacto global en el devenir de la enfermedad a través del tratamiento de una pequeña subpoblación tumoral. Es por ello que la evaluación y caracterización de las CTCs en pacientes de NSCLC -donde la enfermedad diseminada es frecuente al diagnóstico- representa una estrategia particularmente atractiva para la comprensión del mecanismo de diseminación tumoral y la monitorización clínica con el fin de guiar la estrategia terapéutica^{194,195}.

Las CTCs aparecen en circulación en un número muy bajo por lo que su manejo requiere de métodos altamente sensibles. En la última década se han venido desarrollando distintas tecnologías para el aislamiento de CTCs -no limitadas exclusivamente al inmunoaislamiento^{128,196}- y que han mostrado resultados prometedores en NSCLC; sin embargo la cantidad de información disponible es limitada en comparación con otros tipos tumorales^{197,198}. Distintos estudios con *Cell Search*® -la única tecnología aceptada por la FDA para la enumeración de CTCs- ha demostrado la utilidad de la enumeración de CTCs en NSCLC y su asociación con un peor pronóstico clínico^{122,199,200}. Sin embargo, la dependencia del marcador epitelial EpCAM para el inmunoaislamiento de CTCs representa un reto para la aplicabilidad de esta metodología en pacientes de NSCLC. Se ha observado que las CTCs

de NSCLC presentan una expresión especialmente heterogénea de esta proteína y en ocasiones la detección de este marcador típicamente epitelial puede disminuir como consecuencia de la expresión de un patrón transcripcional pseudo-mesenquimal⁴¹.

Paralelamente, se ha descrito la expresión de EpCAM frecuentemente incrementada en NSCLC sugiriendo su participación en la carcinogénesis^{201,202}. Es por ello que nos centramos en esta subpoblación de CTCs EpCAM⁺ para la caracterización de su perfil de expresión génica en NSCLC y con el fin de profundizar en el conocimiento de su biología. En este sentido, poco se conoce de la biología de las CTCs EpCAM⁻ en NSCLC y su influencia en la progresión de la lesión metastásica; habiendo tanto estudios que abogan por una participación activa de esta subpoblación en la progresión tumoral¹³⁷, como estudios en NSCLC en los que inciden en la limitación de esta subpoblación para dictaminar el devenir clínico²⁰³. Sin duda, el desarrollo de nuevas tecnologías EpCAM-independientes y un conocimiento más profundo de la biología de las CTCs contribuirán al perfeccionamiento de la evaluación de CTCs en NSCLC como herramienta clínica.

En este escenario, distintos estudios previos orientados a la caracterización de la expresión génica de CTCs en NSCLC han abordado el análisis de determinados subgrupos de genes -vinculados principalmente a un perfil epitelial- en muestras enriquecidas en CTCs^{204,205}. En este trabajo, la combinación del inmunoaislamiento de CTCs EpCAM-dependiente seguido de una caracterización global de su perfil de expresión mediante la amplificación del transcriptoma completo e hibridación en *microarray* de la librería de cDNA resultante permite la obtención de un perfil de expresión de CTCs para NSCLC. Este perfil de expresión destaca una vinculación con funciones celulares relacionadas con movimiento, adhesión y diferenciación celulares; además de una activa comunicación célula-célula a través de las rutas PI3K/AKT, ERK1/2 y NF- κ B -descritas con anterioridad en progresión tumoral y metástasis del cáncer de pulmón^{206,207}. Finalmente, identificamos *NOTCH1* como un conductor central dentro de esta red de interacciones y cuya expresión en pacientes se asocia a un pronóstico pobre.

La vía de Notch es una ruta de comunicación inter-celular altamente conservada implicada en la regulación del desarrollo y diferenciación celulares²⁰⁸. Notch ha demostrado participar activamente en la homeostasis y la reparación de daño celular en el pulmón, habiéndose observado su deregulación asociada a la patogénesis de distintas enfermedades pulmonares como enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar, cáncer de pulmón y lesiones pulmonares congénitas²⁰⁹. Además, en un reciente meta-análisis, Yuan *et al.* consiguieron vincular la sobreexpresión de esta vía con un mayor riesgo de diseminación linfática, mayor estadio tumoral y menor supervivencia en NSCLC²¹⁰. Complementariamente, la expresión de HES1, un efector subyacente en la ruta de Notch, ha demostrado estar asociado a una menor supervivencia en NSCLC²¹⁰. En este contexto, y considerando que la expresión de la vía de Notch se encuentra alterada en más del 30% de los NSCLC²¹¹, el desarrollo de terapias dirigidas representa un atractivo clínico siendo a su vez los inhibidores de γ -secretasa (GSI) e inhibidores de ADAM las dianas más frecuentes para la regulación de la vía (Figura 37)^{212,213}.

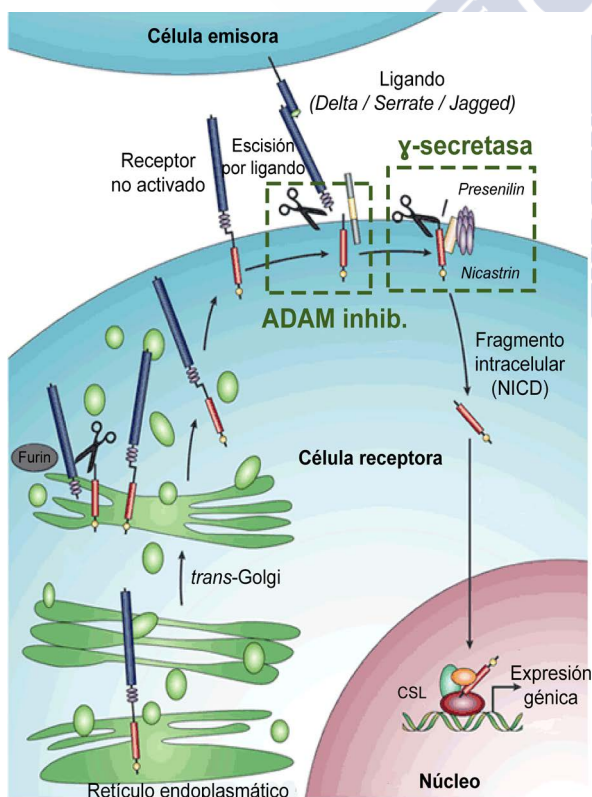


Figura 37. La vía de señalización de Notch e inhibidores de la ruta.

La unión a ligando promueve la escisión del dominio extracelular del receptor de Notch por metaloproteasas de la familia ADAM. El fragmento carboxilo terminal anclado a membrana es procesado por el complejo γ -secretasa -constituido por *presenilin* y *nicastrin* entre otros- para dar lugar a un dominio intercelular de Notch (NICD) que se translocará al núcleo celular para participar en la regulación de la expresión génica. Los 4 tipos de receptores de Notch son sintetizados como péptidos inmaduros en el retículo endoplasmático y procesados en el aparato de Golgi para su migración y heterodimerización en la superficie de la membrana celular. La inhibición de ADAM o el complejo de la γ -secretasa resultaría en la interrupción de la ruta de señalización de Notch. Adaptado de Fortini *et al*²¹⁴.

Dentro de esta ruta de señalización, la actividad de Notch1 juega un papel crítico en la migración y adhesión tumorales mediada por la pérdida de interacciones célula-célula e inducción de características de célula madre²¹⁵. La ablación *in vivo* de Notch1 en modelos murinos de adenocarcinoma ha demostrado reducir dramáticamente la formación y carga tumoral; demostrando así la implicación de Notch1 en la iniciación, proliferación y supervivencia de modelos de NSCLC²¹⁶. Asimismo, la inhibición de la vía de Notch con GSIs ha demostrado inducir la apoptosis en SCC de manera caspasa-dependiente e independiente²¹⁷. Complementariamente, la down-regulación de Notch1 ha demostrado correlacionar con la up-regulación de miR-34a, implicado en la inhibición de la proliferación e invasión en NSCLC a la vez que estimula la apoptosis²¹⁸.

Son varios los estudios que abogan por una participación de la vía de Notch en la adquisición de características de EMT vinculadas a resistencia a terapia y metástasis^{219,220}; del mismo modo que su silenciamiento con siRNA ha demostrado revertir el proceso de EMT y disminuir la invasión y proliferación en NSCLC²²¹. Finalmente, Notch1 ha demostrado también promover la invasión en cáncer de pulmón mediante la regulación de MMPs y cuya expresión se ve significativamente reducida tras el tratamiento con GSI²²².

Conforme a estos resultados proporcionamos también una serie de genes validados por RT-qPCR derivados del perfil de las CTCs EpCAM⁺ en NSCLC avanzado y vinculados a la vía de señalización de Notch1. Galectina-3, una lectina reguladora de la proliferación y adhesión celular es indicadora de una mala prognosis en NSCLC participando de la movilidad, invasión celular y metástasis²²³⁻²²⁵. De manera similar, la expresión de *PTP4A3* en NSCLC se ha encontrado asociada al estadio clínico y la diseminación metastásica mediada por la formación de vasos vasculares y linfáticos²²⁶. Coherentemente, la supresión de *PTP4A3 in vitro* con siRNAs ha demostrado inhibir la migración e invasión de células de cáncer de pulmón^{227,228}. Por último, *ITGB3* ha sido descrita recientemente como un mediador de la adhesión focal participando en la regulación de Ras²²⁹, y cuya inhibición por miR-98²³⁰ o miR let-7c²³¹ previene la proliferación, migración e invasión en NSCLC.

Dentro de nuestra cohorte de 42 pacientes estos biomarcadores han demostrado capacidad para predecir la progresión tumoral. Coherentemente, la expresión de *GADPH*, un indicador indirecto de la carga tumoral total, correlaciona con estos resultados asociándose niveles altos de expresión a una progresión temprana y menor supervivencia. Remarcablemente, la expresión de estas moléculas fracasa a la hora de predecir la supervivencia global con excepción de *ITGB3* que es capaz de discriminar significativamente entre aquellos pacientes con mayor riesgo de exitus.

El contraste de nuestros biomarcadores con las variables clínicas más frecuentes en cáncer de pulmón identifica la presencia de metástasis óseas como la variable clínica con mayor poder pronóstico para Supervivencia libre de progresión dentro de nuestra cohorte de pacientes. El Estado funcional, considerado el factor pronóstico más potente en cáncer de pulmón, no alcanza la significación estadística dentro de nuestra cohorte probablemente limitado por tamaño muestral. El contraste de nuestros marcadores con la presencia de metástasis óseas nos permite identificar *GAPDH*, *NOTCH1* y *PTP4A3* como marcadores con valor pronóstico independiente para Supervivencia libre de progresión del mismo modo que *ITGB3* para Supervivencia global. Adicionalmente, la elaboración de un modelo matemático de regresión logística nos permite establecer a estos tres biomarcadores (*GAPDH*, *NOTCH1* y *PTP4A3*) como la combinación de marcadores con mayor potencia para la clasificación de pacientes de acuerdo a su progresión temprana definida como aquella progresión anterior a los 4 meses desde el diagnóstico.

Por último, la creación de una variable combinada constituida a partir de estos 3 biomarcadores con valor pronóstico independiente para PFS permite discriminar significativamente entre aquellos pacientes con un peor pronóstico para Supervivencia libre de progresión y Supervivencia global. Asimismo, el contraste de esta variable con la presencia de metástasis óseas arroja su valor pronóstico independiente dentro de nuestro grupo de pacientes.

Dentro de este escenario, la caracterización de las CTCs permite determinar los mecanismos moleculares implicados en la diseminación metastásica a la vez que proponer de una serie de biomarcadores con potencial aplicabilidad clínica.

Sin embargo, la capacidad de esta población de Células Tumorales Circulantes para derivar en lesiones metastásicas está influida enormemente por un entorno en el que se desarrolla¹⁰. Es por ello que, de manera complementaria al trabajo desarrollado en CTCs, es posible atajar la diseminación tumoral desde una intervención indirecta, no centrada directamente en la supervivencia de la célula tumoral, sino centrada en la modulación del entorno que proporciona de las condiciones necesarias para su supervivencia.

La capacidad célula tumoral para mantenerse viable y potencialmente metastásica viene determinada en gran medida por su capacidad para subvertir procesos fisiológicos hacia una actividad pro-tumorigénica en la que la comunicación celular desempeña un papel vital. Esta comunicación puede producirse de distintas formas y mediante estímulos de distinta naturaleza y rango, entre ellas, la comunicación mediada por vesículas extracelulares -y por exosomas en concreto- ha atraído atención por su capacidad para transportar estímulos pro-tumorigénicos encapsulados en una membrana lipídica; haciendo posible así la comunicación entre células muy distantes en el organismo e incrementando el rango de influencia tumoral a un nivel sistémico^{63,232}. Dentro de este marco de comunicación global, serán algunos los tejidos y células huésped los que interpreten los estímulos derivados del exosoma tumoral y respondan a los mismos en lo que se denomina el microambiente tumoral⁵¹. La formación de este microambiente comienza paralelamente al desarrollo tumoral primario y de manera independiente a la población de Células Tumorales Circulantes, pero es su combinación la que determinará la capacidad de colonizar de la Célula Tumoral Diseminada⁵². Es, por tanto, la comunicación extracelular, otro de los factores que participan en la diseminación tumoral y cuya interferencia está abriendo vías prometedoras a nivel clínico.

En relación a esta comunicación, actualmente se está empezando a caracterizar esta población de vesículas extracelulares y los mecanismos que la regulan; y no ha sido hasta la última década cuando se ha establecido una vinculación entre los exosomas y el proceso tumoral^{62,233}. Con este objetivo, hemos partido de un modelo celular en cáncer de endometrio que ofrece la posibilidad de realizar una caracterización de los exosomas orientada a su perfil proteico dentro de un marco de EMT. Adicionalmente, el abordaje proteómico por SILAC nos permite el marcaje simultáneo de todo el contenido proteico celular permitiendo la evaluación conjunta de las fracciones de proteoma, exosoma y secretoma soluble.

Este proceso de EMT, como ya hemos explicado con anterioridad, está determinado por la sobreexpresión del factor de transcripción ETV5 dando lugar a una línea celular, H-ETV5, con el mismo fondo genético que su equivalente epitelial HEC-1A pero con una capacidad de diseminación metastásica incrementada^{48,49}. Hasta donde se conoce, esta es la primera vez que se realiza una caracterización del exosoma en un modelo "dicotómico" de EMT. Sí se tiene constancia de un abordaje -no centrado en EMT- en cáncer colorrectal orientado a la comparación por MS del perfil proteico de los exosomas de una línea celular procedente una lesión primaria (SW480) y una línea celular establecida a partir de una lesión metastásica obtenida del mismo paciente un año después (SW620)²³⁴.

El análisis del proteoma de ambas líneas de cáncer de endometrio nos permite realizar una caracterización del tipo celular. De entre el total de proteínas identificadas encontramos la modulación positiva de 35 proteínas en HEC-1A, destacándose entre ellas la presencia de distintas citoqueratinas (KRT7, KRT8, KRT18 y KRT19). Esta familia de proteínas son un reconocido marcador epitelial cuya expresión se encuentra reducida en procesos derivados de EMT como consecuencia de una profunda reorganización del citoesqueleto y la pérdida de polaridad celular^{235,236}. Asimismo, este descenso en la expresión de citoqueratinas mediado por la sobreexpresión de ETV5 ya ha sido reportado con anterioridad para esta línea celular⁴⁸.

La sobreexpresión de ETV5 ha demostrado favorecer una actividad protectora de la apoptosis inducida por estrés a través de la sobreexpresión de DHRS2 y la estabilización de p53²³⁷. DHRS2 aparece modulada significativamente en H-ETV5 en conjunción con otras moléculas vinculadas al estrés celular como HSP90A1A, HS90AB1, HSPA4, HSPD1, HSPA9 o HSPA1A y cuya presencia está asociada también a la supervivencia celular^{238,239}. Todas estas observaciones confirman el perfil proteómico de las líneas tumorales que conforman nuestro modelo a la vez que coinciden con estudios previos realizados sobre estas líneas celulares¹⁸⁹.

El análisis del secretoma deplecionado de exosomas nos permite realizar una caracterización de las proteínas solubles secretadas por ambas líneas de manera diferencial. De un total de 503 eventos, se identificaron 35 proteínas moduladas positivamente para H-ETV5. Un análisis funcional de estas proteínas revela un enriquecimiento en moléculas implicadas en la evasión de la apoptosis del mismo modo al encontrado en el proteoma de esta misma línea celular. Por otro lado, las proteínas positivamente moduladas en el secretoma de HEC-1A destacan la capacidad de estas células de formar y remodelar contactos adherentes entre células adyacentes. Las uniones adherentes son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis epitelial y factor clave en la regulación de la migración celular e invasión tumoral²⁴⁰. El programa transcripcional de EMT se caracteriza por una profunda remodelación del citoesqueleto y la pérdida de estas uniones estrechas lo cual favorece la pérdida de polaridad celular y un aumento de movilidad celular característico de las células mesenquimales²⁴⁰. A la vista de las características resaltadas en ambos perfiles de secretomas podemos certificar cómo el secretoma concuerda de la fisiología de la célula de la que procede y a la vez que participa en el mantenimiento de sus características de tumorigenicidad²⁴¹.

Adicionalmente, la caracterización del secretoma deplecionado de exosomas nos permite establecer diferencias entre el contenido proteico secretado libre por la célula tumoral -con un rango de acción corto- y aquellas moléculas que son encapsuladas en exosomas de manera específica y con capacidad de alcanzar tejidos distantes. Esta diferenciación no ha sido abor-

dada con frecuencia y son pocos los estudios que distinguen entre aquellas proteínas que son secretadas libres al medio extracelular y aquellas que lo hacen encapsuladas. En un estudio realizado por Park y *et al.* en 2010 consiguieron identificar una importante participación de la población exosomal en el perfil metastásico contenido en el secretoma de células tumorales crecidas en hipoxia²⁴². Curiosamente, 13 de las 21 proteínas (61,9%) identificadas como moduladas en el exosoma de HEC-1A aparecen también como moduladas en su secretoma deplecionado de exosomas mientras que no se identificaron elementos comunes para las proteínas moduladas para el secretoma soluble y exosoma de H-ETV5. En este sentido, la capacidad del secretoma deplecionado de exosomas para guiar la transformación tumoral en tejidos adyacentes es algo pendiente de evaluación y que permitirá acotar la participación de las distintas fracciones extracelulares en el microambiente tumoral.

El análisis del contenido proteico exosomal nos ha permitido identificar 56 proteínas comunes en ambos lanzamientos (HEC-1A *heavy* / H-ETV5 *middle* y HEC-1A *middle* / H-ETV5 *heavy*) siendo 16 de las cuales no detectadas en el secretoma. De entre estas 16 moléculas somos capaces de identificar varios marcadores de aislados exosomales vinculados a la familia de las tetraspaninas (CD9, CD63 y CD81) y EpCAM. Además, junto a la presencia de estos marcadores de membrana podemos identificar también la presencia de PCD6IP, un marcador de localización citosólica y que junto a la ausencia de HSP90B1, permite certificar la naturaleza exosomal de nuestros purificados¹⁶².

Es de resaltar la presencia de EpCAM dentro de este grupo de marcadores vinculados a exosomas. Actualmente son numerosos los estudios que han reportado un enriquecimiento de esta molécula en los preparados de exosomas²⁴³, lo que, unido a las dificultades técnicas que existen actualmente para la obtención de muestras puras, hace que distintos autores hayan propuesto este marcador para la realización de inmunoaislamientos de exosomas de manera similar a como se ha venido realizando con las CTCs¹²⁹. En un estudio realizado por Tauro y colaboradores el inmunoaislamiento -EpCAM dependiente- de exosomas de cáncer de colon ofreció un rendimiento

significativamente más alto que aquellos obtenidos por ultracentrifugación y separación en gradiente¹⁶⁰; sin embargo, el cáncer colorrectal es un tipo de tumor que se caracteriza por unos niveles altos de expresión de EpCAM²⁴⁴, por lo que queda por determinar la viabilidad y eficiencia de este abordaje en aquellos tipos tumorales o celulares con una expresión de EpCAM más heterogénea²⁴⁵. Por último, al igual que ocurre con las CTCs, poco se conoce sobre la influencia de las distintas subpoblaciones de exosomas EpCAM⁻²⁴⁶. Alternativamente, son algunos los trabajos que han abordado el inmunoaislamiento EpCAM-independiente de exosomas^{247,248}.

Finalmente, el análisis de los aislados de exosomas de ambas líneas nos permite identificar aquellas proteínas que aparecen moduladas significativamente en ambas líneas celulares. Atendiendo a las proteínas up-reguladas significativamente para H-ETV5 se identificaron un total de 10 proteínas apareciendo únicamente HSPA8 (o HSP7C) como modulada en ambos marcos. Funcionalmente, HSPA8 aparece como supresor de la proteína quinasa dependiente de estrés JNK (SRK1) participando de este modo en la supervivencia mediante la supresión de la apoptosis²⁴⁹. Recientemente, un estudio elaborado por Shan y colaboradores ha identificado HSPA8 como diferencialmente expresado en estadios iniciales de carcinoma de endometrio y tejido normal adyacente al tumor por lo que su evaluación ha sido propuesta como un posible biomarcador de utilidad clínica en cáncer de endometrio²⁵⁰. Adicionalmente, su interferencia consiguió reducir significativamente la proliferación y promover la apoptosis en las líneas de cáncer de endometrio HEC-1B y RL-95-2²⁵⁰. En este sentido, se ha descrito un incremento de la expresión de ETV5 ligado al frente de invasión del carcinoma endometrial²⁵¹, por lo que la identificación de HSPA8 como positivamente modulada en el exosoma de H-ETV5 podría permitir la evaluación a través de la biopsia líquida de esta molécula como herramienta de *screening* o biomarcador de diagnóstico temprano.

Por otro lado, el análisis de las proteínas positivamente moduladas en el exosoma de HEC-1A nos ofrece un perfil completamente distinto en el que abundan proteínas implicadas en la composición y organización de la matriz extracelular y la integración de señales de adhesión, movilidad y prolifera-

ción celular vía integrinas. En este sentido se ha reportado una importante capacidad de los exosomas⁶⁸ de interactuar y remodelar la matriz extracelular participando de este modo en el microambiente tumoral, además, la comunicación vía integrinas ha demostrado una función clave en la determinación de las lesiones metastásicas⁸¹.

Coherentemente, hemos identificado un descenso significativo en la capacidad de adhesión *in vitro* de la línea tumoral H-ETV5 asociado a su fenotipo mesenquimal. En cambio, sí que se observa un incremento en la capacidad de estas células de adherirse a distintos sustratos presentes en la MEC. Distintos ensayos realizados por Colás y colaboradores atribuyen este incremento a la capacidad de H-ETV5 de establecer adhesiones focales rápidamente con distintos componentes de la matriz⁴⁸, lo que a su vez facilitaría las propiedades migratorias e invasivas reportadas para esta línea celular^{48,251}. A raíz de estas observaciones, hemos podido demostrar que la funcionalización de la superficie de una placa con exosomas de HEC-1A es capaz de favorecer de manera significativa la adhesión de la propia célula tumoral; mientras que la funcionalización con exosomas de H-ETV5 no es capaz de producir este efecto. Sin embargo, sí podemos observar que la adhesión de H-ETV5 se ve incrementada *in vitro* cuando expuesta a una superficie funcionalizada con exosomas procedentes de HEC-1A, algo que concuerda con la composición diferencial del exosoma y que favorecería el establecimiento de puntos de anclaje entre H-ETV5 y los exosomas fijados a la superficie de la placa. Asimismo, el estudio realizado por Colás *et al.* identificó LLP (*Lipoma preferred partner protein*) como una molécula implicada en la regulación de ETV5 pero que a su vez participa en la transducción de señales derivadas de las adhesiones focales permitiendo establecer un vínculo entre la formación de adhesiones focales, EMT y la invasividad tumoral dentro de nuestro modelo⁴⁸.

Por último, atendiendo a la diseminación tumoral hematológica, la lámina endotelial constituye la primera barrera física que la Célula Tumoral Circulante debe atravesar en su proceso colonizador. Esta colonización tumoral está a su vez favorecida por una inducción sostenida del estímulo inflamatorio derivado del proceso tumoral^{252,253}. Esta inflamación es capaz de

alterar la homeostasis vascular favoreciendo un incremento de la permeabilidad celular y la expresión de proteínas de adhesión destinadas a facilitar la extravasación de leucocitos en circulación -diapedesis-²⁵⁴. En este sentido, se ha reportado en distintas ocasiones cómo el tratamiento con exosomas tumorales favorece la activación y permeabilidad del tejido endotelial^{73,255}. Nuestros resultados arrojan un incremento de la adhesión de H-ETV5 a monocapas endoteliales de Ea.hy926 y células HUVEC cuando tratadas previamente con exosomas procedentes de HEC-1A. Este incremento de adhesión responde a la expresión de moléculas de adhesión (SELE, VCAM1 e ICAM1) sobre la superficie del endotelio y que cuya sobreexpresión ha demostrado anteriormente participar en el *homing* de la célula tumoral^{256,257}. En este sentido, una limitación de la respuesta inflamatoria inhibiría presumiblemente la capacidad de las células tumorales de anidar en el tejido endotelial. Adicionalmente, VCAN, una proteína significativamente modulada para el exosoma de HEC-1A, ha demostrado implicación en el reclutamiento de células linfoides y mieloides que participan en la producción de citoquinas inflamatorias y cuya inhibición se ha sugerido como una posible diana terapéutica orientada a la metástasis²⁵⁸.

Todas estas observaciones constituyen un escenario en el que el exosoma participa de manera crucial en la colonización metastásica vía hematológica; destacando a su vez la influencia del exosoma de HEC-1A en el proceso de condicionamiento y adhesión de la Célula Tumoral Circulante. HEC-1A es una célula de fenotipo epitelial e inicialmente no destinada a alcanzar la circulación y anidar en tejidos distantes; sin embargo, podemos observar cómo su influencia va más allá de un simple proveedor de células tumorales, sino que a través de la fracción exosomal participa de manera activa en la diseminación metastásica (Figura 38). Comparativamente, observamos cómo el exosoma de H-ETV5, además de representar una fracción muy minoritaria del total del exosoma tumoral en circulación, carece de algunas de las características que participan en el acondicionamiento del nicho pre-metastásico.

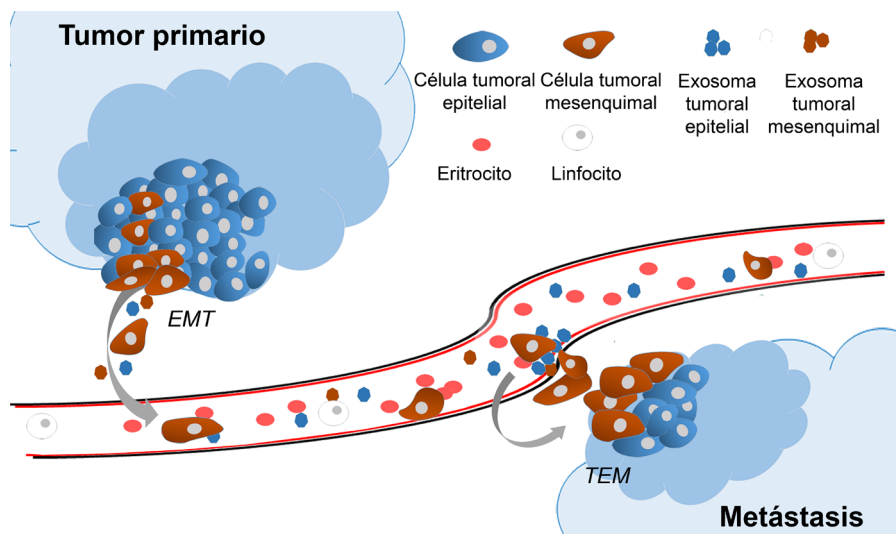


Figura 38. El exosoma tumoral en el anidamiento de la Célula Tumoral Diseminada.

En tumor primario está compuesto por una mayoría de células tumorales epiteliales. Envetualmente algunas de las cuales sufrirán un proceso de EMT favoreciendo su movilidad e incorporación al torrente sanguíneo. Algunas de estas células abandonarán el torrente sanguíneo para dar lugar a nuevos núcleos tumorales. Algunas de estas células diseminadas sufrirán un proceso inverso de EMT recuperando así algunas de las propiedades de célula epitelial. El exosoma tumoral procederá de todo el conjunto de células tumorales que constituyen el tumor primario existiendo una representación mayoritaria de exosoma procedente de célula tumoral epitelial. Este exosoma en circulación preserva la capacidad de activar el tejido endotelial además de conservar una capacidad adhesiva ausente en el exosoma derivado de célula tumoral pseudo-mesenquimal. EMT: *Transición Epitelio-Mesénquima*. TEM: *Transición Mesénquima-Epitelio*. Fuente propia.

De confirmarse estas observaciones, un abordaje clínico orientado a la metástasis debería considerar la influencia de los exosomas a la vez que enfatizar en la necesidad de intervenir en esta ruta de comunicación tumoral mediante la limitación de la cantidad de exosomas tumorales liberados -ya sea mediante una reducción de la carga tumoral bruta o la disrupción de la capacidad de las células tumorales de liberar estas vesículas- o bien limitando la capacidad de estas vesículas de interaccionar con el tejido huésped -ya sea limitando la funcionalidad de estos exosomas tumorales o favoreciendo una actividad protectora en las células receptoras-. Finalmente, el desarrollo de estrategias orientadas al exosoma *epithelial-like* permitiría re-evaluar y atraer de nuevo la atención sobre la participación e influencia del tumor primario en el proceso de metástasis.





CONCLUSIONES





Capítulo 10. Conclusiones

- 1- El inmuno-aislamiento y enriquecimiento de CTCs EpCAM⁺ permite la obtención de un perfil de expresión génica específico de CTC en NSCLC.
- 2- El perfil de expresión de CTCs en NSCLC destaca la presencia de funciones vinculadas a la supervivencia, proliferación y movilidad celular.
- 3- *NOTCH1* participa de manera relevante en la biología de la CTCs. La inhibición de la vía de Notch representa una potencial diana terapéutica específica de CTC de interés clínico.
- 4- La expresión de *GAPDH*, *NOTCH1*, *LGALS3*, *ITGB3* y *PTP4A3* en muestras enriquecidas de CTCs de NSCLC presentan capacidad pronóstica revelándose como potenciales biomarcadores en circulación.
- 5- El SILAC representa una alternativa adecuada para la búsqueda de biomarcadores en exosomas.
- 6- El programa transcripcional de EMT en HEC-1A provoca un descenso en la capacidad de adhesión de la Célula Tumoral Circulante.
- 7- Proteoma y secretoma de H-ETV5 presentan un perfil de EMT orientado a la supervivencia celular y la evasión de la apoptosis.
- 8- El exosoma en circulación procedente de la célula tumoral epitelial contiene proteínas de matriz que participan en la adhesión y anidamiento de la Célula Tumoral Circulante.
- 9- El exosoma tumoral de HEC-1A promueve la activación y expresión de proteínas de adhesión en el tejido endotelial.



ANEXO

Escenario clínico del cáncer de pulmón y cáncer de endometrio





Capítulo 11. El carcinoma de pulmón

11.1. El pulmón: estructura y función

Los pulmones son los órganos encargados del intercambio gaseoso. Ubicados en la caja torácica se dividen en 2 y 3 lóbulos que limitan a ambos lados del mediastino. Estructuralmente, los pulmones componen un entramado arboriforme formado por bronquios y bronquiolos encargados de conducir el aire inhalado hasta los alveolos pulmonares, los cuales constituyen evaginaciones del epitelio para el intercambio gaseoso (Figura 39)²⁵⁹. Este intercambio gaseoso tiene lugar en los septos inter-alveolares donde el epitelio alveolar y una lámina de tejido conectiva altamente vascularizada entran en contacto.

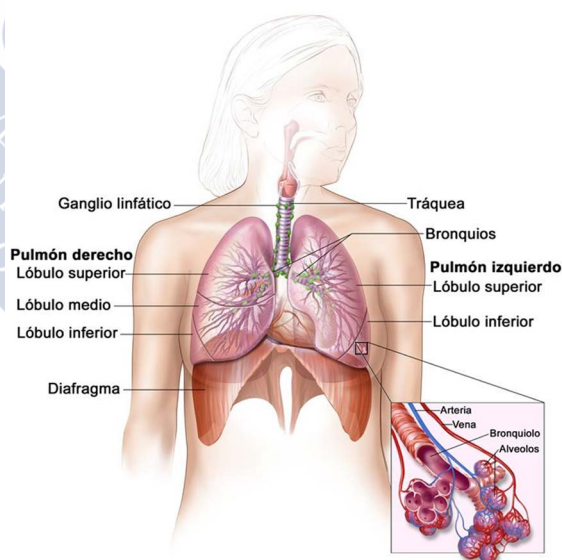


Figura 39. Anatomía del sistema respiratorio humano. Localización de los principales elementos estructurales del aparato respiratorio humano y detalle de la estructura alveolar. Adaptado de Graaff²⁵⁹.

11.2. Factores de riesgo del CP

El consumo de tabaco es el principal factor etiológico en el desarrollo de cáncer de pulmón; teniendo el resto de factores una incidencia global inferior al 10%²⁶⁰. Esta asociación puede encontrarse no sólo en consumidores sino también en personas expuestas al humo de tabaco indirectamente²⁶¹.

El tabaco y el humo de los cigarrillos presentan una composición química compleja de entre la que se han identificado más de 5.300 compuestos; estando 62 de ellos clasificados como carcinógenos²⁶⁰. Actualmente, son numerosas las evidencias experimentales que han demostrado la implicación del tabaco en todos los pasos de la carcinogénesis. Destacan por su número e incidencia distintos hidrocarburos aromáticos poli-cíclicos (PAHs), las nitrosaminas derivadas del tabaco, distintos compuestos radioactivos como el Po²¹⁰, radicales libres o metales pesados²⁶⁰. Además, es posible encontrar compuestos con gran capacidad adictiva como la nicotina, y sobre la que algunos estudios han sugerido también una actividad co-carcinogénica²⁶¹.

De entre los carcinógenos no derivados del tabaco destacan el gas radón -responsable de la mayoría de los casos de CP en no fumadores- que al desintegrarse origina subproductos activos que pueden ser inhalados y alcanzar el tejido pulmonar²⁶². Por otro lado, el asbesto es un compuesto mineral fibroso que al inhalarse provoca una respuesta inflamatoria crónica que incrementa el riesgo de CP²⁶³. Finalmente, otros factores como la terapia de reemplazamiento hormonal (HRT)²⁶⁴ o la acrilamida alimentaria²⁶⁵ han sido en ocasiones asociados también al riesgo de desarrollar procesos neoplásicos aunque su implicación no ha sido plenamente confirmada.

11.3. Prevención y *screening* del CP

El CP es una enfermedad en la que el principal componente etiológico es un producto adictivo promovido por la industria, el tabaco. Las principales actuaciones preventivas deben ir destinadas a promover una cesación en su consumo. La prevención para carcinógenos no derivados del tabaco se centrará en limitar su exposición y, si necesario, una exposición controlada.

Actualmente el único protocolo recomendado para el *screening* de cáncer de pulmón es la tomografía computarizada de baja dosis (LDCT)²⁶⁶. Existe evidencia de que el seguimiento anual de pacientes de alto riesgo por LDCT es capaz de reducir hasta en un 20% la mortalidad específica de cáncer de pulmón²⁶⁷.

11.4. Sintomatología del CP

Estrechamente vinculada a la aparición de problemas respiratorios (tos persistente, dolor de pecho, falta de aliento, tos sanguinolenta o respiración sibilante). En la mayoría de los casos el CP no produce síntomas hasta que se encuentra en un estado avanzado por lo que es frecuente que aparezca acompañado de otra sintomatología, cuadros de fatiga o pérdida de peso. Puede presentarse también junto a otras patologías como crisis repetidas de neumonía e inflamación o agrandamiento de los ganglios en el área de los pulmones²⁶⁸.

11.5. Diagnóstico del CP

El diagnóstico inicial se realiza a través de un examen físico y, cuando sospecha, la utilización de técnicas de imagen no invasivas (radiografía del tórax, TAC, PET). Adicionalmente se podrán incluir procedimientos como MRI (*Magnetic Resonance Imaging*) orientados a la búsqueda de metástasis -en especial cerebral y ósea- o afectación nodular. Si se confirma la lesión, se procederá a la recopilación de información histopatológica con el fin de clasificar y estadificar la lesión antes de proceder al tratamiento²⁶⁹. La biopsia de tejido se podrá obtener mediante una broncoscopia o una punción trans-bronquial o trans-torácica con el fin de acceder al tejido sospechoso. En los últimos años, mejoras tecnológicas asistidas como han proporcionado un acceso al tejido a biopsiar menos invasivo permitiendo la biopsia de pacientes otrora no biopsiables^{269,270}.

11.6. Clasificación del CP

11.6.1. Clasificación histopatológica

La clasificación de las lesiones originarias en el pulmón ha sido compleja y a menudo insuficiente debido su gran heterogeneidad. Además, un procedimiento diagnóstico y actitud terapéutica similares ha dificultado tradicionalmente su estratificación. La incorporación en los últimos años de nuevas terapias derivadas de una estratificación histológica y molecular ha posibilitado la reevaluación de la clasificación histopatológica del cáncer de pulmón (Figura 40)^{271,272}.

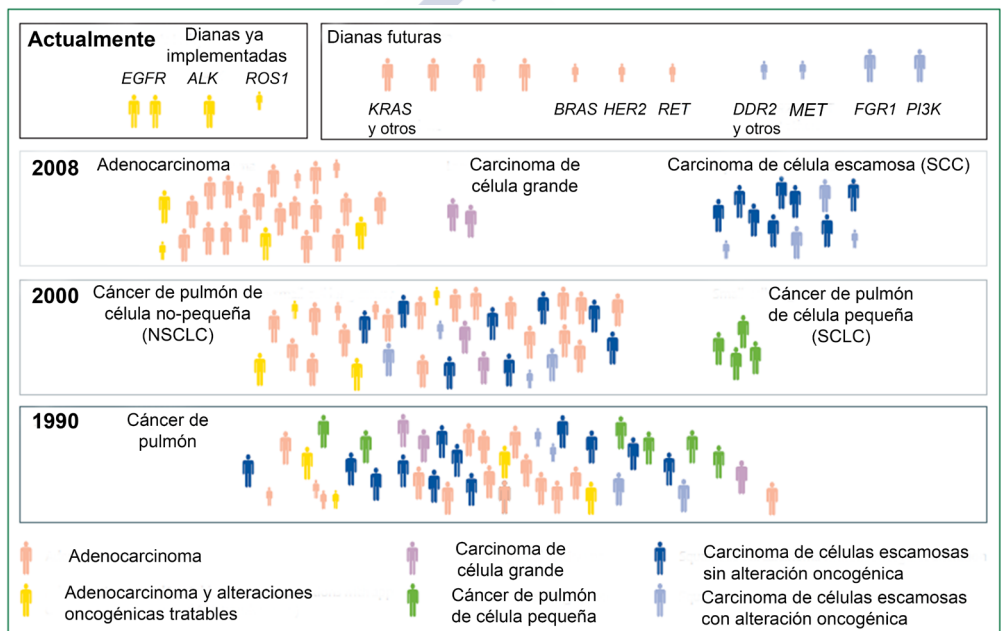


Figura 40. Evolución en el tiempo de la clasificación histológica del cáncer de pulmón. Los diferentes colores denotan distintos subtipos histológicos. Adaptado de Reck *et al.*²⁷⁰

11.6.1.1. Lesiones pre-invasivas

Se caracterizan por la adquisición progresiva de alteraciones tumorigénicas. Si bien más del 70% de los diagnósticos en CP se realizan en estadios avanzados de la enfermedad, la necesidad de un diagnóstico precoz ha atraído gran atención a este tipo de lesiones.

- **Displasia de células escamosas / Carcinoma *in situ*.** Representan un espectro continuo de cambios histológicos no invasivos que preceden al carcinoma de células escamosas²⁷³.
- **Hiperplasia adenomatosa atípica.** Proliferación anormal de neumocitos a lo largo de las paredes alveolares. Considerada una lesión precursora del adenocarcinoma pulmonar periférico²⁷³.
- **Hiperplasia difusa idiopática neuroendocrina.** Lesión precursora de los tumores carcinoides²⁷³.
- **Adenocarcinoma *in situ*.** Tumores de menos de 3 cm con crecimiento lepidico puro²⁷³.

11.6.1.2. *Cáncer de pulmón de célula no-pequeña (NSCLC)*

Se clasifican en función de su apariencia al microscopio. Representan alrededor del 85% de los cánceres de pulmón que se diagnostican. Histológicamente representan un espectro muy variado en el que distinguen tres grandes subgrupos.

- **Adenocarcinoma:** Es el subtipo histológico más frecuente de CP llegando a representar el 40% de los casos. Se caracteriza por la formación de estructuras tubulares o glandulares y/o la presencia de material de secreción. Se reconocen varios subtipos en función de su invasividad y patrón histológico (Figura 41)²⁷².
- **Carcinoma de células escamosas (SCC):** Representa el 25-30% del total de casos de CP. Se caracteriza por la dediferenciación del epitelio bronquial adquiriendo una estructura atípica, no ciliada y con la presencia de queratina y perlas córneas. Se reconocen distintos subtipos en función del patrón histológico predominante (Figura 41)²⁷².

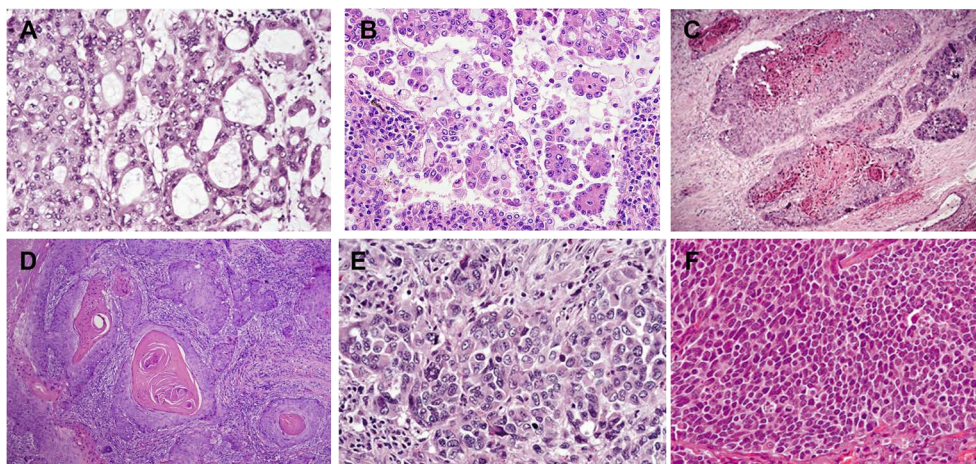


Figura 41. Principales subtipos histológicos en cáncer de pulmón. A) Adenocarcinoma invasivo con diferenciación acinar. *Eosina & Hematoxilina x400*. B) Adenocarcinoma con crecimiento micropapilar. Las células tumorales crecen en pequeños grupos papilares sin núcleo fibrovascular. *Eosina & Hematoxilina x400*. C) Carcinoma de células escamosas. El tumor crece en grupos en un estroma desmoplástico. Las células tumorales muestran queratinización y perlas córneas. *Eosina & Hematoxilina x100*. D) Carcinoma de células escamosas. *Eosina & Hematoxilina x100*. E) Carcinoma de células grandes. El tumor crece en grupos sin una clara diferenciación glandular o escamosa. Las células son relativamente grandes con abundante citoplasma y cromatina vesicular con nucléolos ocasionales. *Eosina & Hematoxilina x400*. F) Carcinoma de células pequeñas. El tumor consiste en una lámina de pequeñas células con una alta tasa mitótica, escaso citoplasma y cromatina granular. *Eosina & Hematoxilina x400*. Adaptado de Beasley *et al.*²⁷³

- **Carcinoma de células grandes:** Representa en torno al 10% de los casos de CP. Se caracteriza por la presencia de células poligonales indiferenciadas con un gran núcleo y citoplasma abundante (Figura 41). Se distinguen distintos subtipos entre los que se incluye el carcinoma neuroendocrino, el carcinoma basal, el carcinoma linfo-epitelial, el carcinoma de células claras y el carcinoma de células grandes rabdoide²⁷².

- **Otros adenocarcinomas:** Agrupan histologías menos frecuentes como el adenocarcinoma mucinoso invasivo coloide, el adenocarcinoma fetal o el adenocarcinoma entérico con una histología similar a la del tejido gastrointestinal²⁷².

11.6.1.3. Cáncer de pulmón de célula pequeña (SCLC)

Representa en torno al 15% del total de casos de cáncer de pulmón y se caracteriza por la presencia de grupos de células tumorales de pequeño tamaño, forma redondeada / fusiforme, escaso citoplasma, que proliferan a gran velocidad y diseminan con facilidad (Figura 41). Presentan una alta agresividad localizándose preferentemente en la zona central de los pulmones pudiendo comprimir vasos y órganos localizados a ese nivel²⁷².

11.6.1.4. Otras lesiones invasivas

Recogen lesiones poco frecuentes como los tumores carcinoides de origen neuroendocrino (<2% de las lesiones de CP invasivas), el carcinoma adenoescamoso con diferenciación glandular y escamosa; y el carcinoma de célula no-pequeña con diferenciación sarcomatoide²⁷².

11.6.2. Clasificación clínico-patológica: TNM

La determinación del estadio clínico-patológico permite una descripción estandarizada de los tumores, la comparación de resultados entre distintos estudios clínicos y la clasificación de pacientes en estadios dentro de los cuales el pronóstico y la estrategia terapéutica es similar²⁷⁴ (Tabla 16).

Tabla 16. Clasificación TNM del cáncer de pulmón

Estadíaaje		Criterios
Carcinoma oculto		TX, N0, M0
Estadio 0		Tis, N0, M0
Estadio I	IA	T1, N0, M0
	IB	T2, N0, M0
Estadio II	IIA	T1, N1, M0
	IIB	T2, N1, M0 ó T3, N0, M0
Estadio III	IIIA	T3 (ó T1 ó T2 con N2), N0, N1 ó N2, M0
	IIIB	Cualquier T, N3 (ó cualquier N con T4), M0
Estadio IV		Cualquier T, cualquier N, M1

Descriptores TNM**Tumor primario (T)****TX:** El tumor primario no puede ser evaluado**T0:** Sin evidencia de tumor primario**Tis:** Carcinoma *in situ***T1:** Tumor de ≤ 3 cm sin invasión en el bronquio principal**T1a:** Tumor de ≤ 2 cm**T1b:** Tumor entre >2 y ≤ 3 cm**T2:** Tumor entre 3- 7 cm con cualquiera de las siguientes características. 1) Afectación del bronquio principal. 2) Invasión de la pleura visceral. 3) Atelectasia o neumonitis obstructiva sin afectar al pulmón entero.**T2a:** Entre 3- 5 cm**T2b:** Entre 5 -7 cm**T3:** Tumor > 7 cm o de cualquier tamaño invadiendo la pared torácica, diafragma, nervio frénico, pleura mediastínica, pericardio parietal; o un tumor a menos de 2 cm de la carina principal sin invadirla o asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva del pulmón entero o existencia de nódulos(s) tumoral(es) separadas del tumor primario en el mismo nódulo.**T4:** Tumor de cualquier tamaño que invade mediastino, corazón, vasos, tráquea, nervio laríngeo, esófago, vertebras o carina; o nódulos tumorales distantes en un lóbulo ipsilateral distinto**Ganglios linfáticos regionales (N)****NX:** No evaluados**N0:** No existen metástasis linfáticas regionales**N1:** Metástasis en ganglios linfáticos peribronquiales homolaterales y/o hiliares homolaterales e intrapulmonares**N2:** Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos homolaterales y/o subcarinales**N3:** Metástasis ganglionares linfáticas mediastínicas contralaterales, hiliares contralaterales, escalénicas homolaterales o contralaterales, o supraclaviculares**Metástasis a distancia (M)****MX:** No evaluados**M0:** No existen metástasis a distancia**M1:** Metástasis a distancia**M1a:** Existencia de nódulos(s) tumoral(es) separado(s) del tumor primario, en un lóbulo del pulmón contralateral; tumor con nódulos pleurales o derrame pleural (o pericárdico) maligno**M1b:** Metástasis a distancia

11.6.3. Clasificación según el Estado Funcional del paciente

Esta clasificación, si bien muy sencilla, surge en 1982 como una medida estandarizada del bienestar y la capacidad física del paciente²⁷⁵. Con frecuencia se utiliza para orientar decisiones clínicas como la disposición a recibir quimioterapia, el ajuste de la dosis o la intensidad de los cuidados paliativos de los pacientes oncológicos.

Tabla 17. Clasificación según el Estado Funcional del paciente

Clasificación del Estado Funcional del paciente por la ECOG	
0.	Asintomático
1.	Sintomático pero capaz de desarrollar vida cotidiana
2.	Sintomático. En cama menos del 50% de tiempo. Capaz de asearse pero no de trabajar
3.	Sintomático. En cama más del 50% de tiempo pero no atado a ella. Capacidad de aseo limitada
4.	Confinado a una cama. No capaz de valerse ni asearse
5.	Muerto

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

11.7. Patología molecular del CP

La estrecha vinculación del cáncer de pulmón con el consumo de tabaco provoca una patogénesis molecular basada en la acumulación de anomalías genéticas, que cuando afectan a pro-oncogenes o genes reguladores claves, favorecen el proceso tumorigénico. Esta asociación da lugar a una vasta diversidad de alteraciones genéticas y morfológicas que queda patente en la heterogeneidad del cáncer pulmón.

11.7.1. Bases moleculares del NSCLC

El NSCLC se caracteriza por la agrupación de distintos subtipos histológicos de características muy heterogéneas y la acumulación de distintas anomalías genéticas (Figura 42). De entre estas anomalías es posible destacar algunas secuencias que aparecen con más frecuencia -algunas recurrentes en cáncer- o aparecen asociadas a determinadas histologías o fenó-

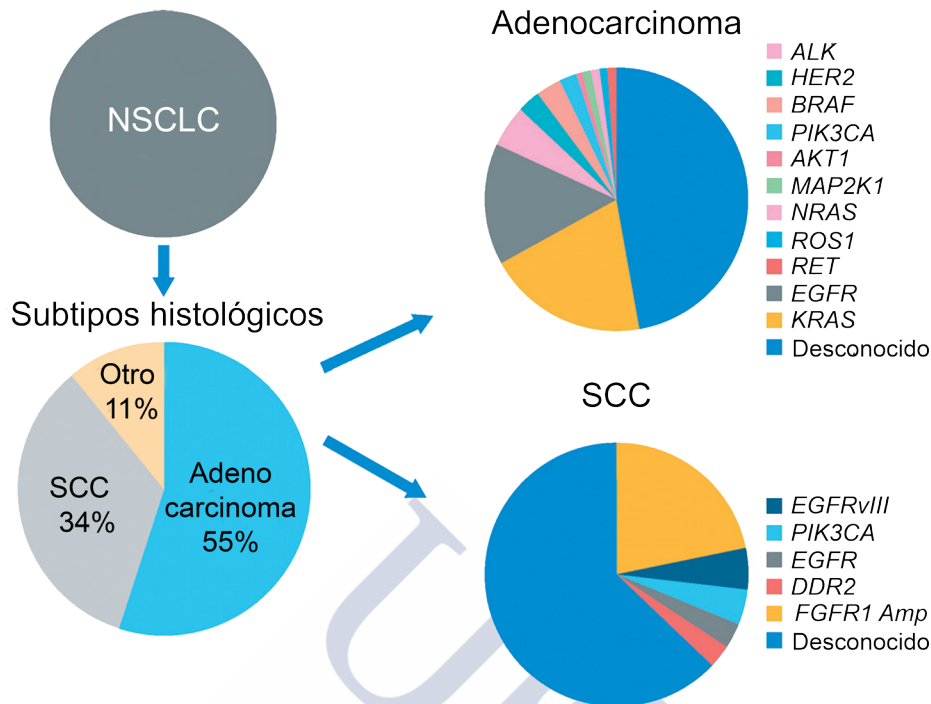


Figura 42. Evolución de clasificación genómica de NSCLC y alteraciones genéticas más frecuentes por tipo histológico. Adaptado de Shames *et al.*²⁷⁶

menos de resistencia. Destacan también algunas anomalías no vinculadas al consumo de tabaco que denotan cierta inestabilidad genética hereditaria y que, al contrario de la tendencia general, aparecen en pacientes jóvenes.

- **EGFR:** Asociado frecuentemente a adenocarcinomas en no fumadores. Considerada una lesión iniciadora. La mutación de EGFR suele implicar una hiper-activación de la actividad TK en respuesta a EGF. Estos pacientes presentan buena respuesta al tratamiento con TKI²⁷⁷.
- **ALK:** Asociado a adenocarcinomas en no fumadores. Considerada una lesión iniciadora. Suele aparecer de manera exclusiva a alteraciones en *EGFR* y *KRAS*. La translocación de ALK da lugar a una proteína de fusión oncogénica capaz de activar las rutas PI3K y MAPK de manera inespecífica^{276,278}. La naturaleza oncogénica de esta proteína de fusión ha sido confirmada en modelos animales siendo capaz de originar lesiones del tipo adenocarcinoma en el epitelio pulmonar²⁷⁹.

- **KRAS y BRAF:** La activación de miembros de la familia RAS aparece en torno al 20-25% de los adenocarcinomas. Asociado a un historial de consumo de tabaco es considerada una de las lesiones más precoces en NSCLC. Aparecen de manera exclusiva a la mutación de *ALK* y *EGFR* sugiriendo un origen molecular distinto²⁷⁷.

- **ROS1 y RET:** Aparecen hasta en el 2% de los NSCLC asociados generalmente a adenocarcinomas en jóvenes no fumadores. Suelen aparecer de manera exclusiva. Son receptores TK cuyo reordenamiento es capaz de originar distintas proteínas de fusión con actividad pro-oncogénica²⁸⁰.

- **PIK3CA:** Alterado en hasta el 3% de los NSCLC y vinculado a la activación constitutiva de rutas de proliferación y supervivencia mediada por *PTEN* y *AKT1*. Esta anomalía puede originarse por mutación o amplificación. Suele aparecer secundariamente vinculado a otras anomalías oncogénicas como *EGFR* o *KRAS* vinculándose a menudo a fenómenos de resistencia a TKIs²⁷⁷.

- **MET:** Su amplificación de *MET* aparece en el 7% de los NSCLC y a menudo vinculada a fenómenos de resistencia frente a la inhibición de *EGFR*. Codifica para un receptor con actividad TK y sobre la que subyacen múltiples rutas vinculadas a la proliferación celular, invasividad e inhibición de apoptosis²⁷⁷.

- **ERBB2:** También conocido como *HER2*. Asociado a adenocarcinomas en jóvenes no fumadores. Aparece de manera exclusiva a la mutación de *EGFR* o *KRAS*. La mutación de este receptor implica la activación de rutas de proliferación, diferenciación y migración a través de *PI3K/AKT* y *MEK/ERK*²⁷⁷.

- **FGFR1:** Estrechamente vinculado al consumo de tabaco. Este gen codifica para un receptor TK con actividad sobre las rutas de *RAS/RAF/MAPK* y *PI3K/AKT*. Su exceso de función conlleva la salida de apoptosis y el estímulo de procesos proliferativos y migratorios²⁷⁷.

11.7.2. Bases moleculares del SCLC

Los estudios realizados en SCLC han revelado una tasa de mutaciones muy alta, acorde a la alta exposición a mutágenos²⁸¹. De entre las anomalías detectadas se encuentran algunas comunes en CP, pero también algunas específicas de SCLC. Las alteraciones más destacables es la pérdida casi uniforme de la función de los genes supresores de tumores *TP53* y *RB1*, consideradas lesiones iniciadoras de SCLC. La inactivación de p53 se asocia a una función anti-apoptótica y base para la acumulación de nuevas mutaciones. Por su parte, *RB1* está implicado en la progresión del ciclo celular y la represión de genes inductores de pluripotencia. En consonancia, modelos animales dan lugar a SCLC cuando inactivado el eje *Trp53/Rb1*²⁸¹.

La amplificación o sobre-expresión de los proto-oncogenes *MYC* se ha identificado en el 20-30% de los casos de SCLC. Distintos miembros de la familia participan como activadores transcripcionales bajo cuya función se encuentran genes implicados en la progresión en el ciclo celular y la regulación del desarrollo. Por último, estudios recientes han destacado también la presencia de determinadas alteraciones en *NOTCH1*, *PI3K*, *PTEN* y *BCL2* favoreciendo la adquisición de propiedades invasivas y anti-apoptóticas^{281,282}.

11.8. Tratamiento del CP

El tratamiento en CP NSCLC se realiza principalmente a través de técnicas quirúrgicas, radiológicas y químicas; las cuales pueden aplicarse solas o en combinación. Por el contrario, el tratamiento del CP SCLC, por sus características clínicas, se realiza fundamentalmente mediante quimioterapia.

11.8.1. Cirugía

La opción quirúrgica está destinada principalmente a atajar la enfermedad en los estadios iniciales abarcando distinto grado de resección en función de la extensión del tumor y el estado cardiopulmonar del paciente²⁸³. Ocasionalmente, es posible el uso de quimioterapia o aproximaciones radiológicas en pacientes de riesgo o posquirúrgicos^{283,284,285}.

11.8.2. Radioterapia

El tratamiento con radioterapia se puede agrupar bajo los siguientes preceptos: 1) Terapia adyuvante para pacientes operables y sin contraindicaciones. 2) Terapia de primera línea para pacientes no aptos para cirugía, ya sea por si sola o en combinación con quimioterapia -quimio-irradiación-. 3) Terapia paliativa para pacientes con cáncer de pulmón incurable.

La técnica más extendida actualmente es la radioterapia tridimensional conformada (3D-CRT)²⁸⁶. Eventualmente es posible también la utilización de técnicas radiológicas -solas o en combinación con quimioterapia- para prevenir la aparición de la metástasis cerebrales en pacientes posquirúrgicos o con lesiones puntuales³.

11.8.3. Quimioterapia

Utilizada como tratamiento de primera línea para los estadios más avanzados sin características moleculares que aconsejen el uso de otras alternativas. Puede utilizarse también con finalidad neoadyuvante / adyuvante. Frecuentemente consiste en la combinación de un derivado del platino con otra droga para su administración en 4-6 ciclos espaciados en varias semanas. Las drogas más frecuentes para el tratamiento de CP y su mecanismo de acción vienen detalladas en la Tabla 18².

Tabla 18. Principales compuestos quimioterápicos en el tratamiento de CP

Droga	Actividad
Cisplatino	Alquilante con actividad genotóxica
Carboplatino	
Paclitaxel	Antimitótico. Estabilización de los microtúbulos
Paclitaxel conjugado con albúmina	
Docetaxel	
Gemcitabina	Antimetabolito. Antagonista de pirimidinas
Pemetrexed	Antimetabolito. Antagonista de folato
Vinorelbina	Antimitótico. Impide la polimerización de los microtúbulos
Vinblastina	
Irinotecano	Genotóxico. Inhibidor de la topoisomerasa
Etopósido	

11.8.4. Terapia dirigida

A día de hoy existen numerosas dianas propuestas para el desarrollo de terapias dirigidas estando, sin embargo, únicamente aprobadas por la FDA las terapias contra *EGFR*, *ALK* y *ROS1* en el tratamiento de primera línea de NSCLC. Estas terapias dirigidas presentan como principal limitación la aparición de resistencias por lo que a menudo se utilizan en combinación con quimioterapia²⁸⁷.

11.8.4.1. Terapia dirigida contra ALK

ALK codifica para un receptor transmembrana de la familia de los receptores de insulina cuya función biológica no está claramente definida²⁸⁷. Su actividad oncogénica es consecuencia de su translocación con distintos genes -frecuentemente *EML4*- para dar lugar a una proteína de fusión con el dominio TK constitutivamente activado. Esta activación es capaz de provocar la activación aberrante de rutas efectoras como PI3K, STAT o MAPK²⁸⁸.

Clínicamente, son numerosos los ensayos que han conseguido demostrar una gran respuesta de crizotinib, un inhibidor de ALK, en pacientes portadores de la alteración frente al tratamiento convencional con quimioterapia²⁸⁷⁻²⁸⁹. Además, los pacientes portadores de la alteración han demostrado un mayor riesgo de progresión y diseminación en estadios avanzados habiendo reportado Kim *et al.* una supervivencia media de 14,3 meses en pacientes ALK⁺ frente a los 33,3 meses en pacientes sin la alteración de ALK²⁹⁰. Lamentablemente, pese a una gran respuesta inicial al tratamiento con TKI, es frecuente el desarrollo de resistencias mediada por la adquisición de mutaciones secundarias en *ALK* o distintos oncogenes como *KRAS*, *EGFR* o *MET*²⁸⁸. Actualmente se está haciendo un gran esfuerzo hacia el desarrollo de una nueva generación de inhibidores de ALK de entre los que podemos destacar ceritinib y alectinib recientemente aprobados por la FDA para el tratamiento de NSCLC ALK⁺ avanzados y que han demostrado una respuesta potente en pacientes resistentes a crizotinib^{291,292}.

11.8.4.2. *Terapia dirigida contra EGFR*

EGFR es un receptor de tirosina kinasa de la familia de Erb/HER cuya activación está asociada a una mayor proliferación y supervivencia celular²⁹³. La presencia de mutaciones en *EGFR* ha demostrado ser sensible al tratamiento con TKI (gefitinib y erlotinib principalmente). Actualmente, erlotinib está indicado para el tratamiento de NSCLC avanzado o metastásico con mutaciones activadoras de EGFR, como terapia de mantenimiento con enfermedad estable tras quimioterapia y para el tratamiento en segunda línea de NSCLC avanzado^{294,295}. Por otro lado, gefitinib ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes con NSCLC avanzado y no respondedor a quimioterapia²⁹⁶. Al igual que ocurre con los inhibidores de ALK es frecuente la recurrencia después de una respuesta inicial positiva mediada por la aparición de nuevas mutaciones en la secuencia de *EGFR*, la amplificación del oncogén *MET*, mutaciones en *PI3KCA* o fenómenos derivados de EMT²⁷⁷. Actualmente existen un gran número de ensayos clínicos orientados al tratamiento de estas alteraciones en segunda o tercera línea con distintos TKI²⁹³.

11.8.4.3. *Terapia dirigida contra ROS1:*

ROS1 es un receptor TK que participa en la regulación de distintos procesos vinculados a la apoptosis, supervivencia, diferenciación, proliferación, migración y transformación celular. Asimismo, ROS1 comparte en torno al 50% de la secuencia con el receptor de ALK por lo que son numerosos los inhibidores de ALK que han mostrado actividad en este grupo de pacientes²⁹⁷.

La translocación del oncogén c-ros 1 se ha descrito en 0,7-1,7% de los pacientes con NSCLC. Crizotinib, un inhibidor aprobado para ALK, ha demostrado respuesta en el 70-80% de NSCLC con esta translocación, llegando incluso a superar la respuesta obtenida en pacientes con la translocación de ALK²⁹⁷.

11.8.4.4. Otras terapias dirigidas en desarrollo

Al margen de las dianas incorporadas en clínica, actualmente se encuentran en desarrollo numerosas terapias dirigidas contra otras alteraciones frecuentes en cáncer de pulmón como *KRAS* -alterado en el 25% de los adenocarcinomas-, *BRAF*, *HER2*, *RET* o *VEGF*²⁹⁸⁻³⁰⁰. Los resultados preliminares arrojan tasas de repuestas variables y en ocasiones una gran toxicidad.

11.8.5. Inmunoterapia

Representa, junto a las terapias dirigidas, la alternativa a la quimioterapia más prometedora. De entre los distintos estudios orientados a la inmunoterapia destacan aquellos centrados en el eje PD-1 /PD-L1. PD-1 es un receptor de superficie expresado en células T activadas que al unirse a su ligando PD-L1 debilita la respuesta inmune con el fin de modular la respuesta inflamatoria y de autoinmunidad. Dentro de este marco, se ha observado cómo algunos tumores son capaces de expresar PD-L1 con el fin de suprimir la respuesta inmune de las células T citotóxicas a los antígenos tumorales³⁰¹. Nivolumab -un anticuerpo contra PD-1- ha demostrado buenos resultados en NSCLC refractarios y actualmente se encuentra bajo desarrollo clínico³⁰².

11.9. Factores pronóstico y predictivos en CP

Generalmente se consideran tres tipos de factores pronóstico y predictivos. Primeramente, los parámetros clínicos asociados al paciente de manera independiente como su interacción con la enfermedad; los parámetros patológicos (que vienen contenidos en la clasificación TNM y del Estado Funcional del paciente en cáncer de pulmón); y finalmente los biomarcadores de origen genético y molecular.

11.9.1. Factores clínico-patológicos

Distintos estudios han conseguido identificar hasta 169 factores pronóstico no-genéticos de distinta relevancia en NSCLC avanzado^{7,303}, sin embargo su estandarización y extensión es muy variable. Un estudio realizado por Carter *et al.*⁷ permitió la evaluación de más de 1.300 trabajos en NSCLC para la determinación de los factores pronóstico más informativos de acuerdo a unos rigurosos criterios de calidad y extrayéndose el Estado Funcional del paciente como la variable más ampliamente evaluada y con mayor potencia pronóstica (Figura 43).

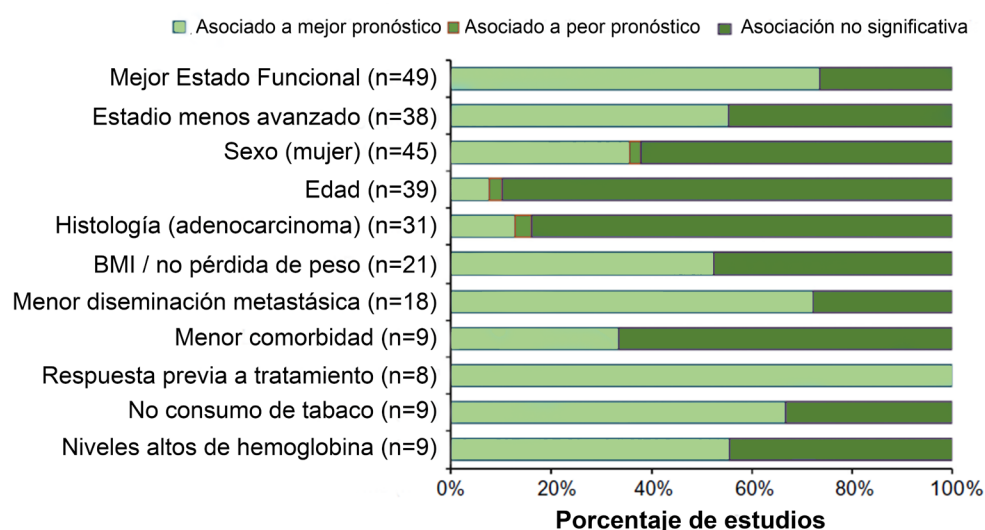


Figura 43. Factores pronóstico más representativos en NSCLC. Entre paréntesis, el número de estudios evaluados. El código de color refleja su asociación significativa a buen o mal pronóstico en los distintos estudios. Adaptado de Carter *et al.*⁷

Atendiendo al desarrollo tumoral, el estadio de la enfermedad y la presencia, número y localización de focos metastásicos representan las variables más ampliamente establecidas y con mayor poder pronóstico.

Por último, el cáncer de pulmón SCLC se sigue tratando como una única entidad histológica y terapéutica por lo que no existen algoritmos establecidos que permitan su subcategorización. Al igual que ocurre en NSCLC, la determinación del Estado Funcional del pacientes y la evaluación del estadio y la extensión de la enfermedad representan los parámetros con mayor valor pronóstico³⁰⁴.

11.9.2. Biomarcadores

La heterogeneidad de NSCLC y su complejidad histológica ha dificultado el establecimiento de biomarcadores; lo que sumado a la ausencia de unos criterios rigurosos ha dificultado la validación de potenciales candidatos. En la última década, el establecimiento de la directrices REMARK permite un reporte adecuado de potenciales biomarcadores³⁰⁵.

Existen, sin embargo, dos biomarcadores para NSCLC asentados clínicamente, estos son la presencia de mutaciones en *EGFR* y el reordenamiento de *ALK*. Adicionalmente se recomienda la evaluación de *ROS1* para determinados subtipos histológicos.

- **Mutación de *EGFR*:** El valor predictivo de EGFR ha sido claramente establecido estableciéndose una supervivencia notablemente más larga en aquellos portadores de EGFR mutado. Adicionalmente, EGFR ha demostrado también valor predictivo habiéndose demostrado incluso la capacidad de determinadas mutaciones de predecir la eficacia del tratamiento²⁸⁷.
- **Reordenamiento de *ALK*:** Pacientes portadores de una alteración en ALK presentan una peor prognosis -mayor riesgo de progresión y diseminación- que aquellos portadores del alelo salvaje. La evaluación de ALK ha demostrado valor predictivo llegándose a predecir la respuesta a tratamiento en función de la pareja de fusión²⁸⁷.
- **Reordenamiento de *ROS1*:** Codifica para un recetor tirosina kinasa con gran homología con la kinasa de *ALK*. Inhibidores de *ALK* han demostrado beneficio en este grupo de pacientes²⁸⁷.

Actualmente se encuentran bajo evaluación como biomarcadores otras mutaciones ocasionales en NSCLC y entre las que se encuentran la alteraciones de *KRAS*, *HER2* o *MET* y cuyo valor como biomarcadores no ha sido plenamente establecido²⁸⁷.

Capítulo 12. El carcinoma de endometrio

12.1. El útero: estructura y función

El útero es el órgano reproductor en el que se produce la gestación de los seres humanos y el resto de mamíferos. Es un órgano muscular hueco, de forma triangular y ubicado en la cavidad pélvica. A sus lados se localizan los ovarios, los cuales conectan con el útero a través de las trompas de Falopio. El útero está dividido a su vez en tres partes: el cuello o cérvix uterino que constituye la parte inferior del útero y conecta con el fondo de la vagina; el istmo uterino localizado en la parte intermedia y que conecta el cuello con el cuerpo uterino que comprende la parte superior y más amplia del útero (Figura 44)²²⁹. Anatómicamente, la pared del útero está compuesta por tres capas: el perimetrio que constituye la capa más externa recubriendo el cuerpo y fondo del útero, el miometrio que forma la capa intermedia y muscular; y la capa más interna y mucosa denominada endometrio.

El endometrio constituye a su vez una lámina fina y altamente vascularizada que recubre el interior del útero y que, bajo un estricto control hormo-

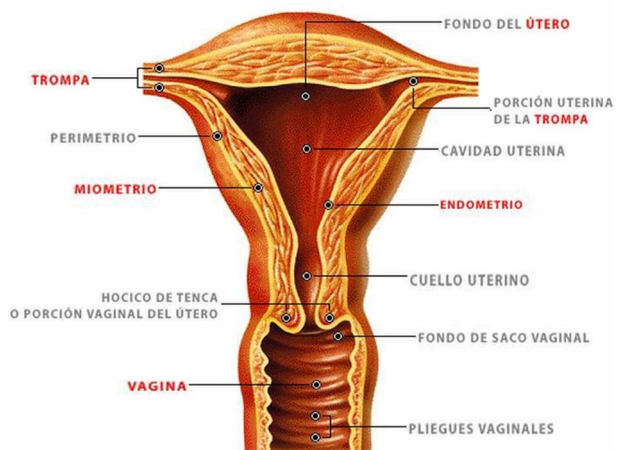


Figura 44. Anatomía del útero humano.
Adaptado de Graaff²⁵⁹

nal, se desarrolla cada ciclo menstrual para albergar al posible embrión³⁰⁶. De no producirse fecundación se descamará durante la menstruación iniciando un nuevo ciclo de ovulación. Histológicamente el endometrio se encuentra constituido por un compartimento epitelial (monocapa que tapiza el interior de la cavidad uterina), uno estromal (compuesto por fibroblastos encargados de regular la implantación) y otro vascular, con la existencia además, de una población de células inmunes residentes^{4,307}.

12.2. Factores de riesgo del CE

No existen factores causales específicos asociados a la aparición de cáncer de endometrio. Sin embargo, sí hay varios factores que han demostrado aumentar la probabilidad de padecer esta enfermedad.

- **Exposición excesiva a estrógenos:** Si bien el estrógeno es una hormona esteroidea fisiológica, su exposición excesiva ha demostrado incrementar el riesgo de CE³⁰⁸. A consecuencia de su capacidad para promover la producción de estrógenos se han identificado a su vez otros factores de riesgo derivados como la obesidad, dietas grasas, la presencia de ovarios poliquísticos o diabetes^{309,310}. La grasa, especialmente en la zona abdominal, es la primera fuente de estrógenos en mujeres post-menopáusicas participando de este modo en el balance hormonal³¹¹. Se ha observado también como el tratamiento con estrógenos formando parte de la terapia de reemplazamiento hormonal (HRT) es capaz de incrementar el riesgo de CE³⁰⁸.

- **Edad y factores menstruales:** El CE aparece con mayor frecuencia en mujeres post-menopáusicas entre los 60-70 años. Además, mujeres con un ciclo menstrual irregular o que nunca han dado a luz (nulíparas) presentan un riesgo incrementado. Mujeres con una menarquía temprana presentan a su vez un mayor riesgo, del mismo modo que mujeres con una menopausia tardía, debido a la acumulación de ciclos de ovulación³¹².

- **Tamoxifeno:** El tamoxifeno es una molécula no esteroidea antagonista del estradiol que se ha utilizado como molécula adyuvante en el tratamiento de cáncer de mama ER⁺ (*Estrogen Receptor⁺*). Se ha observado un peor pronóstico de CE en pacientes tratadas en este sentido³¹³.

- **Susceptibilidad genética:** El 5-10% de los CE tienen un origen hereditario. Entre las asociaciones más fuertes que se han documentado se encuentra el síndrome de Lynch, una variante del cáncer colorrectal hereditario derivado de la alteración del sistema MMR (*Mismatch Repair*) que incrementa hasta en un 20% la probabilidad de desarrollar CE³¹⁴.

Una visión global de los factores de riesgo asociados al CE permite identificar a la exposición a estrógenos y su balance con la progesterona como una de las causas primeras para el desarrollo de CE. Si bien los estrógenos participan en multitud de funciones fisiológicas, su deregulación participa en la estimulación de respuestas proliferativas y anti-apoptóticas a través de rutas como MAPK y PI3K/AKT claves en la progresión tumoral³⁰⁸.

12.3. Prevención y screening del CE

La prevención del CE está orientada sobre todo a la adquisición de unos hábitos saludables identificándose la actividad física y la dieta como factores protectores. Además, el embarazo y la lactancia se han identificado como factores protectores al mantener los niveles de estrógenos bajos⁴. Finalmente, la utilización de anticonceptivos orales ha demostrado poseer un efecto protector también por su contenido en progesterona³¹⁵.

Actualmente no existen evidencias que apoyen la realización de un *screening* orientado al CE siendo la información de las pacientes la actuación más eficaz para la detección precoz de los síntomas⁴.

12.4. Sintomatología del CE

El síntoma más frecuente -más del 90% de las pacientes- en el carcinoma de endometrio es la aparición de un sangrado vaginal anormal. Aquellas pacientes con un estadio avanzado pueden presentar además dolor abdominal o pélvico, distensión abdominal, pérdida involuntaria de peso o dolor durante las relaciones sexuales⁴.

12.5. Diagnóstico del CE

La evaluación inicial del paciente se realiza generalmente mediante un examen pélvico y ecografía transvaginal con el fin de descartar la presencia de pólipos y miomas a la vez que se estima el grosor endometrial. Ante la sospecha clínica, es frecuente también la realización de una biopsia de endometrio con el fin de obtener información histológica detallada. En el caso de biopsia no satisfactoria se recomienda la realización de una histeroscopia diagnóstica y legrado uterino -descamación de la superficie uterina para obtener una muestra de tejido-³¹². Recientemente, Colás y colaboradores identificaron un panel de 20 biomarcadores moleculares orientados a la detección temprana y diagnóstico de CE a partir de aspirados uterinos^{316,317}. Confirmada la lesión se procederá a la caracterización de la misma en función del grado de invasión miometrial y cervical y afectación nodal siendo frecuente la utilización de MRI o la CT (*Computed Tomography*)³¹².

12.6. Clasificación del CE

12.6.1. Clasificación histopatológica

El cáncer de endometrio puede originarse a partir de un tejido endometrial sano, un endometrio menopáusico o atrófico, o partir de un endometrio hiperplásico y/o con lesiones precursoras. La clasificación histopatológica del CE propuesta por la Sociedad Internacional de Ginecología Patológica (SIGP) se basa en la diferenciación de los tipos histológicos en función del tipo celular presente en el área tumoral.

12.6.1.1. Lesiones pre-invasivas

La hiperplasia endometrial se caracteriza por un aumento anormal del tejido endometrial debido al incremento del número de células, mayoritariamente secretoras, que lo conforman. En la mayoría de los casos esta hiperplasia tiene origen en una exposición sostenida a estrógenos llegando a considerar una lesión pre-maligna cuando esta exposición promueve la transformación pro-tumoral. La gravedad de la hiperplasia se clasifica, según la aglomeración arquitectónica y las atipias citológicas, desde hiperplasia típica, derivada de la expansión quística de las células glandulares, hasta una hiperplasia atípica en la cual se altera la estratificación y polaridad celular. Aunque estas lesiones no presentan invasividad se consideran precursoras del Carcinoma Endometrial Endometriode (EECs) en distinto rango (una hiperplasia típica desemboca en CE en el 1,6% de los casos en un plazo medio de 10 años mientras que una hiperplasia atípica desemboca en CE en más del 20% de los casos en un plazo medio de 4 años)^{318,319}.

Por otro lado, la presencia de pólipos endometriales es frecuente en la práctica ginecológica y su transformación maligna infrecuente. Sin embargo, son numerosos los estudios que han establecido una asociación entre la presencia de estos pólipos y el desarrollo de carcinoma de endometrio seroso y de células claras³²⁰.

12.6.1.2. Adenocarcinoma endometriode

Representan el 75-80% de los casos. Se caracterizan por presentar formaciones pseudo-glandulares, mejor o peor definidas, revestidas por células cilíndricas que muestran estratificación y atipia nuclear, aumento del número de mitosis, así como mitosis atípicas y escaso estroma fibroso. Su agresividad es variable y se relaciona con su grado de diferenciación distinguiéndose los siguientes subtipos:

- **Adenocarcinoma con diferenciación escamosa:** Constituyen más del 25% de los EECs. Se presentan como tumores bien diferenciados en forma de agregados celulares o como masas sólidas con citoplasma abundante en tumores de alto grado. Se clasifican en adenocantoma (de buen pronóstico y caracterizado por la presencia de focos de metaplasia escamosa no atípicos) y adenoescamoso (de mal pronóstico y caracterizado por la presencia de células escamosas atípicas)³¹⁸.

- **Adenocarcinoma secretor:** Se distingue porque sus células contienen vacuolas nucleares conteniendo glucógeno³¹⁸.

- **Carcinoma de células ciliadas:** Presenta células ciliadas en al menos el 75% del tumor contenido entre células de adenocarcinoma endometrioide³¹⁸.

- **Carcinoma papilar villo-glandular:** Es un carcinoma usualmente bien diferenciado, que muestra un patrón histológico papilar. Los núcleos tienen escasas atipias y las mitosis son escasas³¹⁸.

12.6.1.3. *Adenocarcinoma no-endometrioide*

- **Adenocarcinoma mucinoso:** Poco frecuente. Se caracteriza por la presencia de formaciones pseudo-glandulares, revestidas por células columnares, muco-secretoras, con núcleos que muestran escasas atipias. Suelen ser de bajo grado y mínimamente invasivos³¹⁸.

- **Adenocarcinoma seroso:** Suponen aproximadamente el 5% de los carcinomas endometriales. Presentan un patrón papilar con la presencia de múltiples tallos fibrovasculares revestidos por cúmulos de células epiteliales atípicas. Tiene un pronóstico pobre y es propenso a la diseminación peritoneal³¹⁸.

- **Adenocarcinoma de células claras:** Comprende el 6% de los carcinomas endometriales y es el CE de peor pronóstico. Está compuesto por células alargadas con un citoplasma rico en glucógeno. Puede presentar un patrón histológico papilar, glandular, sólido o tubuloquístico³¹⁸.

- **Adenocarcinoma mixto:** Tumor caracterizado por la mezcla de carcinomas de tipo I y II³¹⁸.
- **Otros carcinomas:** Poco frecuentes. Incluye el carcinoma de células escamosas -constituido por células indiferenciadas sin componente glandular-, el carcinoma de células transicionales -similar a los carcinomas del tracto urinario-, el carcinoma de células pequeñas -similar al NSCLC- y el carcinoma indiferenciado³¹⁸.

12.6.2. Clasificación clínico-patológica

Esta clasificación propuesta por Bokhman en 1983³²¹ propone un modelo dualístico que diferencia entre el carcinoma de endometrio endometriode (EECs) o de tipo I, y el carcinoma de endometrio no-endometriode (NEECs) o de tipo II de acuerdo a sus características clínicas clínico-patológicas (Tabla 19 y Figura 45). Posteriormente, este modelo ha sido completado mediante la inclusión de parámetros morfológicos, inmunohistoquímicos y genéticos³²².

Tabla 19. Clasificación dualística del CE en función de sus características clínico-patológicas

	Tipo I	Tipo II
Incidencia	> 80%	<20%
Edad	Pre- / Perimenopáusica	>60 años
Histología	Endometriode	Seroso. Células claras
Estimulación estrogénica	Sí	No
Receptores esteroideos	PR ⁺ / ER ⁺	PR ⁻ / ER ⁻
Alteración genética	<i>PTEN</i> (inactivación)	<i>p53</i> (mutación)
Grado histológico	Bajo	Alto
Lesiones precursoras	Hiperplasia endometrial	Endometrio atrófico
Pronóstico	Favorable	Pobre

Adaptado de Murali *et al.*³²³

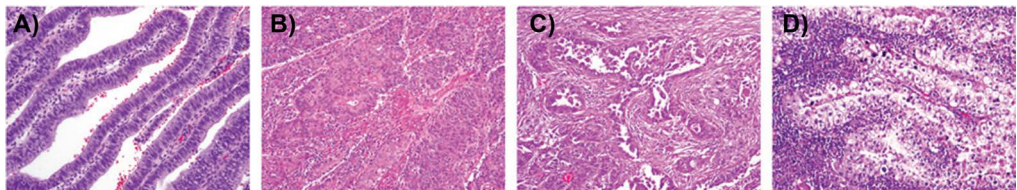


Figura 45. Principales subtipos histológicos del cáncer de endometrio. A) Carcinoma endometriode con diferenciación escamosa grado I. *Eosina & Hematoxilina x100*. B) Carcinoma endometriode grado II. Se puede observar una desestructuración y pérdida de la diferenciación celular. *Eosina & Hematoxilina x100*. C) Carcinoma no-endometriode de histología serosa. Se observan células papilares atípicas con núcleo pleomórfico. *Eosina & Hematoxilina x100*. D) Carcinoma no-endometriode de célula clara. Se observan células cuboidales / alargadas con abundante citoplasma. *Eosina & Hematoxilina x100*. Adaptado de Murali *et al.*³²³

12.6.3. Clasificación según el grado de invasión tumoral: Estadificación F.I.G.O.

La actualización más frecuente para la clasificación del carcinoma endometrial según el grado de invasión tumoral (F.I.G.O.) data de 2012 y viene resumida a continuación (Tabla 20)³²⁴.

Tabla 20. Estadificación FIGO para el carcinoma endometrial

Estadio I	Tumor confinado al cuerpo uterino
IA	Tumor limitado al endometrio o que invade <50% del miometrio
IB	Tumor que invade más del 50% del miometrio
Estadio II	Tumor que invade el estroma del cérvix, pero limitado al útero
Estadio III	Tumor que se extiende local y/o regionalmente
IIIA	Invasión de la serosa del cuerpo uterino y anexos
IIIB	Invasión vaginal o parametrial
IIIC	Metástasis linfática pélvica (IIIC.1) y/o para-aórtica (IIIC.2)
Estadio IV	Invasión de la vejiga y la mucosa intestinal (IV.A) y/o metástasis a distancia (IV.B)

Adaptado de Pecorelli³²⁴

A su vez es posible definir el grado histológico como clasificador y factor pronóstico del CE (Tabla 21). Mientras que todos los NEECs son considerados de alto grado por definición, los EECs pueden clasificarse en función de los siguientes criterios:

Tabla 21. Clasificación del carcinoma endometrial en función del grado histológico

Grado histológico	
GX	No evaluado
G1	EECs bien diferenciado. Menos del 5% de crecimiento sólido y patrones glandulares reconocibles
G2	EECs moderadamente diferenciado con crecimiento sólido parcial (<50%). Muestra glándulas bien formadas entre láminas sólidas de células malignas
G3	EECs poco o no diferenciado. Crecimiento sólido predominante. Glándulas no reconocibles y abundante presencia de atipia y actividad mitótica

Adaptado de Pecorelli³²⁴

12.7. Patología molecular del CE

La patología molecular del CE presenta un modelo dualístico ampliamente aceptado y que, basado en criterios histológicos y genéticos, reconoce dos grandes grupos: el adenocarcinoma de tipo I de morfología endometrioide (EEC) y dependiente de estrógenos; y el carcinoma de endometrio de tipo II (NEEC) y no dependiente de estrógenos. De esta forma, el carcinoma endometrial se desarrolla como la acumulación progresiva de distintas alteraciones genéticas en genes reguladores clave que desembocan en un tejido disfuncional (Figura 46)^{322,325}.

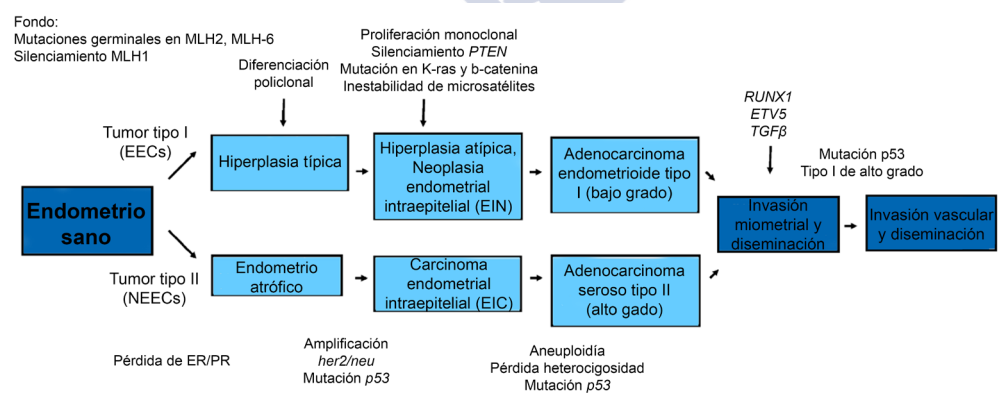


Figura 46. Modelo dualístico de progresión del carcinoma endometrial. Adaptado de Doll *et al.*³²⁵

12.7.1. Cáncer de endometrio de tipo I

Representa el 80% de los casos totales apareciendo en mujeres pre- y post-menopáusicas. En ellos se produce la progresión desde una hiperplasia simple, considerada una lesión precursora, a un adenocarcinoma endometrioide mediada por la acumulación de alteraciones genéticas³²⁶. De entre las alteraciones moleculares que aparecen con más frecuencia en este tipo de tumores destacan aquellas vinculadas a la vía PI3K/AKT. *PTEN*, un regulador negativo de la ruta, aparece como un gen supresor clave y cuyo silenciamiento o delección participa en la adquisición de propiedades proliferativas y migratorias. Además, se ha reportado también la participación de *PTEN* en la regulación de *p53*³²⁵. *PIK3CA* aparece mutado hasta en el 36% de los ECCs y 15% NEECs participando en la fosforilación de *AKT* y su activación constitutiva. Por su parte, la activación de la ruta de *mTOR* promueve en la activación aberrante de *AKT* promoviendo la proliferación celular³²⁷.

La ruta *Ras*/MAPK aparece también alterada con frecuencia participando en la progresión de las lesiones identificándose mutaciones somáticas de *KRAS* en el 18-28% de los EECs. La activación constitutiva de *K-Ras* se asocia con frecuencia a la inestabilidad de microsatélites (MSI). Esta inestabilidad -aparece en el 20% de los EECs- se caracteriza a su vez por una alta tasa de mutación en estas secuencias como consecuencia de una maquinaria de replicación y reparación del DNA defectuosa³²⁷.

La mutación de *CTNNB1* se ha identificado en hasta el 38% de los EECs. *CTNNB1* en condiciones fisiológicas participa en la organización del citoesqueleto y funciona como un activador transcripcional de la vía *Wnt*. La mutación de *CTNNB1* promueve su estabilización y acumulación en el citoplasma provocando una activación permanente de sus efectores³²⁵. Además, *EGFR* y *FGFR* aparecen mutados en el 46 y 16% de los EECs participando en la proliferación, supervivencia y angiogénesis tumoral^{326,328}.

Finalmente, el cáncer de endometrio tipo I está severamente influido por la exposición a estrógenos. Los receptores esteroideos, constituidos por los receptores de progesterona (PR-A y PR-B) y los receptores de estrógenos (ER α y ER β), llevan a cabo una función regulatoria de la actividad hormonal.

Mutaciones en los genes que codifican para estos receptores son capaces de alterar el balance hormonal y favorecen la aparición de características pro-tumorales derivadas de una exposición excesiva a estrógenos. Un descenso de los niveles de progesterona o un exceso de estimulación estrogénica se ha reportado en más del 90% de los EECs³²⁶.

12.7.2. Cáncer de endometrio de tipo II

Los tumores de tipo II (NEECs) representan en torno al 20% de los CE y se caracterizan por una serie alteraciones genéticas diferentes a los EECs y no vinculadas a la exposición a estrógenos³²⁹. Las aberraciones genéticas más frecuentes en este tipo de carcinomas endometriales es la pérdida de función de los genes supresores de tumores p53 y p16; partícipes ambos en la regulación del ciclo celular y la apoptosis³²⁹. Es frecuente también encontrar un incremento de la expresión de ERBB2 como consecuencia de su sobreexpresión o amplificación (Tabla 22). *ERBB2* es un oncogén que codifica para un miembro de la familia de receptores TKs del factor EGF. Una ganancia de función está asociada a un peor pronóstico como consecuencia de la activación constitutiva de rutas de proliferación, migración y supervivencia^{330,331}. Se ha reportado también un descenso de la expresión de E-cadherina en más del 80% de los tumores NEECs el cual participa en la remodelación de las uniones célula-célula y la movilidad celular³²⁹; asociándose de este modo a un peor pronóstico³³².

Tabla 22. Alteraciones genéticas más frecuentes en CE en función del tipo histológico

Aberración genética	% EECs	% NEECs
<i>ER/PR</i> (Expresión)	>90	0-31
<i>PTEN</i> (Pérdida de función)	55-83	10
<i>EGFR</i> (Sobre-expresión)	46	34
<i>PI3KCA</i> (mutación)	28-36	15-50
<i>CTNNB1</i> (ganancia de función)	23-38	Rara
<i>KRAS</i> (activación)	13-26	0-10
<i>FGFR</i> (mutación)	10-16	2
<i>p53</i> (inactivación)	5-17	80-90
<i>p16</i> (inactivación)	10	40
<i>HER2/ERBB2</i> (sobre-expresión)	<3	18-25
<i>HER2/ERBB2</i> (amplificación)	1	17-25

Adaptado de Murali *et al.*³²³

12.8. Tratamiento del CE

La mayoría de los casos de cáncer de endometrio (75%) son diagnosticados en una etapa temprana de la enfermedad (estadios FIGO I o II) por lo que el tratamiento principal es la cirugía. Esta cirugía consiste generalmente en una histerectomía, a menudo junto con una salpingo-ooforectomía (extirpación de los ovarios y trompas de Falopio). En casos más invasivos o de origen dudoso es posible la realización de una histerectomía más agresiva. Es frecuente la evaluación de los nódulos linfáticos para su estadificación o extirpación, sin embargo, su utilidad clínica se encuentra en entredicho en casos tempranos y de nódulos no afectados⁴.

Los CE de tipo II representan el 10-15% de los casos totales de CE, sin embargo, son responsables del 40% de las muertes. Este tipo de cánceres se caracteriza por la alta incidencia de eventos extrauterinos y en especial metástasis linfáticas. En estos casos suele recurrirse a una cirugía radical⁴.

12.8.1. Terapia adyuvante

12.8.1.1. Radioterapia

En pacientes de riesgo medio-alto (edad avanzada, invasión miometrial, estadio avanzado, afectación linfática, histología serosa, etc.) el tratamiento con radioterapia, ya sea mediante radioterapia pélvica externa (EBRT) como braquiterapia, sí ha demostrado mejorar el control loco-regional de la enfermedad⁴.

12.8.1.2. Quimioterapia

La quimioterapia adyuvante no ha demostrado beneficios significativos respecto al tratamiento con radioterapia en estadios de bajo riesgo⁴. En estadios avanzados la quimioterapia neoadyuvante en cambio sí ha demostrado beneficio -especialmente en estadios diseminados y recidivas- en el manejo de la enfermedad. Esta terapia está basada frecuentemente en la combinación de paclitaxel y derivados del platino⁴.

12.8.1.3. Terapia hormonal

Actualmente no existen evidencias robustas para el uso de terapia hormonal en etapas tempranas de CE. En estadios avanzados sí se ha llegado a observar un beneficio derivado del tratamiento con progesterona o análogos frente al desarrollo de CE dependiente de estrógenos⁴, sin embargo, son también algunos los estudios que alertan sobre la aparición de resistencias³³³.

12.8.1.4. Terapias dirigidas

Un conocimiento más detallado de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de CE permite el desarrollo de terapias dirigidas frente a alteraciones frecuentes en esta patología. Actualmente no existen alternativas dirigidas para el cáncer de endometrio implementadas en la práctica clínica.

La ruta mTOR es un regulador central del crecimiento, proliferación y supervivencia celular. Distintos ensayos clínicos con inhibidores de mTOR no han alcanzado las expectativas deseadas con tasas de respuesta inferiores al 10%. Entre las posibles causas de este efecto se encuentra un potente efecto citostático, una inadecuada estratificación de los pacientes o una inhibición deficiente de la ruta. Actualmente se están probando una nueva generación de inhibidores, entre los que se incluye everolimus, para los cuales se ha llegado a una tasa de respuesta del 32% en determinadas subpoblaciones en combinación con letrozol, un inhibidor de la enzima precursora del estrógeno⁴. Existen a su vez terapias dirigidas frente a la alteración EGFR y ERBB2 que no han ofrecido los resultados esperados⁴. Paralelamente, se está evaluando el uso de VEGF como diana terapéutica en CE por su papel en la angiogénesis y la permeabilidad vascular. Anticuerpos monoclonales anti-VEGF como bevacizumab o sunitinib han arrojado tasas de respuesta del 12-15% y los resultados en combinación con otros inhibidores son prometedores⁴. Finalmente, se están desarrollando también terapias dirigidas contra otras dianas como el receptor de FGF cuya amplificación es frecuente; o contra el receptor de la hormona luteinizante cuya expresión aparece alterada con frecuencia.

Existen también en desarrollo inmunoterapias dirigidas a restaurar la actividad inmune antitumoral mediada por PD1 o su ligando PD-L1; y que aparecen alterados en más del 80% de los casos de CE⁴.

12.9. Factores pronóstico y predictivos del CE

12.9.1. Factores clínico-patológicos

Los principales factores pronóstico patológicos vienen determinados por el subtipo, grado histológico y el grado de invasión miometrial. Brevemente, un subtipo histológico II y una pobre diferenciación están asociadas a un peor pronóstico a la vez que el estadio F.I.G.O. representa el factor más importante en el pronóstico de la enfermedad⁸. El grado de invasión linfo-vascular incrementa el riesgo de afectación de los nódulos cervicales y para-aórticos entre 4-6 veces siendo especialmente importante a la hora de administrar terapia adyuvante⁸.

La edad representa también un factor pronóstico significativo habiéndose asociado un mayor riesgo de agresividad y recurrencia en mujeres mayores de 75 años⁸. Algunos estudios han conseguido vincular también la raza como factor pronóstico vinculado a la propensión a determinadas mutaciones conductoras y de agresividad tumoral. Existe sin embargo un fuerte componente socioeconómico que dificulta la extracción de conclusiones⁸.

12.9.2. Biomarcadores

La detección de las alteraciones genéticas más frecuentes en el proceso de carcinogénesis tumoral permite evaluar la agresividad tumoral. Entre estos biomarcadores destaca la evaluación de los receptores hormonales esteroideos, la mutación de *PTEN* como lesión precursora del CE tipo I y el estado de la ruta PI3K/AKT/mTOR la cual aparece de-regulada en el 80% de los cánceres endometriales endometrioides^{8,334}. La determinación del estado del gen supresor de tumores *TP53* es también un factor pronóstico rele-

vante. *TP53* aparece mutado en 54% de los NEECs y más del 90% de los carcinomas serosos; los cuales se caracterizan por un pronóstico pobre. Se ha determinado que aquellas pacientes que presentan p53 mutado tienen un riesgo de exitus 11 veces superior a aquellas que no presentan la mutación¹¹¹. Finalmente, están bajo evaluación otros biomarcadores estrechamente vinculados a la progresión tumoral como *ERBB2*, *VEGF* o miembros de la ruta MEK/ERK entre otros³³⁴.





REFERENCIAS





1. Siegel, R., Miller, K. & Jemal, A. Cancer Statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* **66**, 7–30 (2016).
2. Ettinger, D. S. *et al.* *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Non-Small Cell Lung Cancer.* (2013).
3. Gaspar, L. E. *et al.* The role of whole brain radiation therapy in the management of newly diagnosed brain metastases: A systematic review and evidence-based clinical practice guideline. *J. Neurooncol.* **96**, 17–32 (2010).
4. Morice, P., Leary, A., Creutzberg, C., Abu-Rustum, N. & Darai, E. Endometrial cancer. *Lancet* **6736**, 1–15 (2015).
5. Bradford, L. S., Rauh-Hain, J. A., Schorge, J., Birrer, M. J. & Dizon, D. S. Advances in the Management of Recurrent Endometrial Cancer. *Am. J. Clin. Oncol.* **32**, 1–7 (2013).
6. Riihimäki, M. *et al.* Metastatic sites and survival in lung cancer. *Lung Cancer* **86**, 78–84 (2014).
7. Carter, G. C. *et al.* A comprehensive review of nongenetic prognostic and predictive factors influencing the heterogeneity of outcomes in advanced Non-Small-Cell lung cancer. *Cancer Manag. Res.* **6**, 437–449 (2014).
8. Binder, P. S. & Mutch, D. G. Update on Prognostic Markers for Endometrial Cancer. *Medscape* **10**, 277–288 (2014).
9. Descot, A. & Oskarsson, T. The molecular composition of the metastatic niche. *Exp. Cell Res.* **319**, 1679–86 (2013).
10. Psaila, B. & Lyden, D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 285–93 (2009).
11. Duda, D. G. & Jain, R. K. Premetastatic lung ‘niche’: Is vascular endothelial growth factor receptor 1 activation required? *Cancer Res.* **70**, 5670–5673 (2010).
12. Valastyan, S. & Weinberg, R. A. Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell* **147**, 275–292 (2011).
13. Sleeman, J. P. & Thiele, W. Tumor metastasis and the lymphatic vasculature. *Int. J. Cancer* **125**, 2747–2756 (2009).
14. Westermarck, J. & Kähäri, V. M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* **13**, 781–92 (1999).
15. Guan, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm. Sin. B* **5**, 402–18 (2015).
16. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 417–27 (2011).
17. Bockhorn, M., Jain, R. K. & Munn, L. L. Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed? *Lancet. Oncol.* **8**, 444–8 (2007).
18. Ombrato, L. & Malanchi, I. The EMT universe: space between cancer cell dissemination and metastasis initiation. *Crit. Rev. Oncog.* **19**, 349–61 (2014).
19. Aceto, N. & Bardia, A. Circulating tumor cells clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* **158**, 1110–1122 (2014).
20. Geiger, T. R. & Peeper, D. S. The neurotrophic receptor TrkB in anoikis resistance and metastasis: A perspective. *Cancer Res.* **65**, 7033–7036 (2005).

21. Liu, W. *et al.* Microenvironmental Influences on Metastasis Suppressor Expression and Function during a Metastatic Cell's Journey. *Cancer Microenviron.* **7**, 117–31 (2014).
22. Palumbo, J. S. *et al.* Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* **105**, 178–85 (2005).
23. Palumbo, J. S. Mechanisms linking tumor cell-associated procoagulant function to tumor dissemination. *Semin. Thromb. Hemost.* **34**, 154–160 (2008).
24. Gay, L. J. & Felding-Habermann, B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 123–34 (2011).
25. Tormoen, G. W., Haley, K. M., Levine, R. L. & McCarty, O. J. T. Do circulating tumor cells play a role in coagulation and thrombosis? *Front. Oncol.* **2**, 115 (2012).
26. Lou, X.-L. *et al.* Interaction between circulating cancer cells and platelets: clinical implication. *Chin. J. Cancer Res.* **27**, 450–60 (2015).
27. Wang, X. *et al.* CTC immune escape mediated by PD-L1. *Med. Hypotheses* **93**, 138–139 (2016).
28. Placke, T. *et al.* Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res.* **72**, 440–448 (2012).
29. Gupta, G. P. & Massagué, J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* **127**, 679–95 (2006).
30. Shim, S., Gascoyne, P., Noshari, J. & Hale, K. S. Dynamic physical properties of dissociated tumor cells revealed by dielectrophoretic field-flow fractionation. *Integr. Biol. (Camb)*. **3**, 850–62 (2011).
31. Mego, M. *et al.* CXCR4-SDF-1 interaction potentially mediates trafficking of circulating tumor cells in primary breast cancer. *BMC Cancer* **16**, 127 (2016).
32. Wikman, H., Vessella, R. & Pantel, K. Cancer micrometastasis and tumour dormancy. *Apmis* **116**, 754–770 (2008).
33. Tsai, J. H. & Yang, J. Epithelial – mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes Dev.* **27**, 2192–2206 (2013).
34. Ghobrial, I. M. Myeloma as a model for the process of metastasis: Implications for therapy. *Blood* **120**, 20–30 (2012).
35. Barriere, G. *et al.* Circulating tumor cells and epithelial, mesenchymal and stemness markers: characterization of cell subpopulations. *Ann. Transl. Med.* **2**, 109 (2014).
36. Bonnomet, A. *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **15**, 261–273 (2010).
37. Drake, J. M., Strohbehn, G., Bair, T. B., Moreland, J. G. & Henry, M. D. ZEB1 enhances transendothelial migration and represses the epithelial phenotype of prostate cancer cells. *Mol. Biol. Cell* **20**, 2207–17 (2009).
38. Tiwari, N., Gheldof, A., Tatari, M. & Christofori, G. EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells. *Semin. Cancer Biol.* **22**, 194–207 (2012).

39. Bouyssou, J. M. C. *et al.* Regulation of microRNAs in cancer metastasis. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1845**, 255–265 (2014).
40. Ferreira, M. M., Ramani, V. C. & Jeffrey, S. S. Circulating tumor cell technologies. *Mol. Oncol.* **10**, 374–394 (2016).
41. Lecharpentier, A. *et al.* Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Br. J. Cancer* **105**, 1338–1341 (2011).
42. Oh, S., Shin, S. & Janknecht, R. ETV1, 4 and 5: An oncogenic subfamily of ETS transcription factors. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1826**, 1–12 (2012).
43. Lu, B. C. *et al.* Etv4 and Etv5 are required downstream of GDNF and Ret for kidney branching morphogenesis. *Nat. Genet.* **41**, 1295–1302 (2009).
44. Schlessner, H. N. *et al.* Effects of ETV5 (Ets Variant Gene 5) on Testis and Body Growth, Time Course of Spermatogonial Stem Cell Loss, and Fertility in Mice. *Biol. Reprod.* **78**, 483–489 (2007).
45. Gutierrez-Hartmann, A., Duval, D. L. & Bradford, A. P. ETS transcription factors in endocrine systems. *Trends Endocrinol. Metab.* **18**, 150–158 (2007).
46. Monge, M. *et al.* ERM/ETV5 up-regulation plays a role during myometrial infiltration through matrix metalloproteinase-2 activation in endometrial cancer. *Cancer Res.* **67**, 6753–6759 (2007).
47. Planaguma, J. *et al.* Up-regulation of ERM/ETV5 correlates with the degree of myometrial infiltration in endometrioid endometrial carcinoma. *J. Pathol.* **207**, 422–429 (2005).
48. Colas, E. *et al.* ETV5 cooperates with LPP as a sensor of extracellular signals and promotes EMT in endometrial carcinomas. *Oncogene* **31**, 4778–4788 (2012).
49. Alonso-Alconada, L. *et al.* Molecular profiling of circulating tumor cells links plasticity to the metastatic process in endometrial cancer. *Mol. Cancer* **13**, 223 (2014).
50. Paget, S. the Distribution of Secondary Growths in Cancer of the Breast. *Lancet* **133**, 571–573 (1889).
51. Quail, D. F. & Joyce, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* **19**, 1423–37 (2013).
52. Kaplan, R. N., Rafii, S. & Lyden, D. Preparing the ‘soil’: the premetastatic niche. *Cancer Res.* **66**, 11089–93 (2006).
53. Hanahan, D. & Coussens, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* **21**, 309–22 (2012).
54. Lindau, D., Gielen, P., Kroesen, M., Wesseling, P. & Adema, G. J. The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology* **138**, 105–15 (2013).
55. Drabsch, Y. & ten Dijke, P. TGF β signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **31**, 553–568 (2012).

56. Shuman Moss, L. A., Jensen-Taubman, S. & Stetler-Stevenson, W. G. Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis. *Am. J. Pathol.* **181**, 1895–9 (2012).
57. Høye, A. M. & Erler, J. T. Structural ECM components in the pre-metastatic and metastatic niche. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **11**, 955–967 (2016).
58. Alderton, G. K. Metastasis. Exosomes drive premetastatic niche formation. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 447 (2012).
59. Trams, E. G., Lauter, C. J., Norman Salem, J. & Heine, U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *BBA - Biomembr.* **645**, 63–70 (1981).
60. Pan, B. T., Teng, K., Wu, C., Adam, M. & Johnstone, R. M. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J. Cell Biol.* **101**, 942–948 (1985).
61. Théry, C., Ostrowski, M. & Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 581–93 (2009).
62. Yáñez-Mó, M. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. vesicles* **4**, 1–60 (2015).
63. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 654–9 (2007).
64. Colombo, M. *et al.* Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J. Cell Sci.* **126**, 5553–65 (2013).
65. Bobrie, A. *et al.* Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. *Cancer Res.* **72**, 4920–30 (2012).
66. Fukuda, M. Rab27 effectors, pleiotropic regulators in secretory pathways. *Traffic* **14**, 949–63 (2013).
67. Hemler, M. E. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 801–11 (2005).
68. Ge, R., Tan, E., Sharghi-Namini, S. & Asada, H. H. Exosomes in Cancer Microenvironment and Beyond: have we Overlooked these Extracellular Messengers? *Cancer Microenviron.* **5**, 323–332 (2012).
69. Wolfers, J. *et al.* Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat. Med.* **7**, 297–303 (2001).
70. Ciravolo, V. *et al.* Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy. *J. Cell. Physiol.* **227**, 658–67 (2012).
71. Yu, X. *et al.* Mechanism of TNF- α autocrine effects in hypoxic cardiomyocytes: initiated by hypoxia inducible factor 1 α , presented by exosomes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **53**, 848–57 (2012).
72. Qu, Z., Jiang, C., Wu, J. & Ding, Y. Exosomes as potent regulators of HCC malignancy and potential bio-tools in clinical application. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 17088–17095 (2015).
73. Peinado, H. *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* **18**, 883–91 (2012).

74. Bosman, F. T. & Stamenkovic, I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J. Pathol.* **200**, 423–428 (2003).
75. Hakulinen, J., Sankkila, L., Sugiyama, N., Lehti, K. & Keski-Oja, J. Secretion of active membrane type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) into extracellular space in microvesicular exosomes. *J. Cell. Biochem.* **105**, 1211–1218 (2008).
76. Shay, G., Lynch, C. C. & Fingleton, B. Moving targets: Emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis. *Matrix Biol.* **44**, 200–206 (2015).
77. Costa-Silva, B. *et al.* Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1–7 (2015).
78. Webber, J., Steadman, R., Mason, M. D., Tabi, Z. & Clayton, A. Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Res.* **70**, 9621–9630 (2010).
79. Cho, J. A., Park, H., Lim, E. H. & Lee, K. W. Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells. *Int. J. Oncol.* **40**, 130–138 (2012).
80. Miyazono, K., Ehata, S. & Koinuma, D. Tumor-promoting functions of transforming growth factor- β in progression of cancer. *Ups. J. Med. Sci.* **117**, 143–52 (2012).
81. Hoshino, A. *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **527**, 329–335 (2015).
82. Al-Nedawi, K., Meehan, B., Kerbel, R. S., Allison, A. C. & Rak, J. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 3794–9 (2009).
83. Grange, C. *et al.* Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Res.* **71**, 5346–5356 (2011).
84. Fabbri, M. *et al.* MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E2110–6 (2012).
85. Kahlert, C. & Kalluri, R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J. Mol. Med.* **91**, 431–437 (2013).
86. Yang, M. *et al.* Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Mol. Cancer* **10**, 117 (2011).
87. Luga, V. *et al.* Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell* **151**, 1542–56 (2012).
88. Boelens, M. C. *et al.* Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways. *Cell* **159**, 499–513 (2014).
89. Ono, M. *et al.* Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. *Sci. Signal.* **7**, ra63 (2014).

90. Demory Beckler, M. *et al.* Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 343–55 (2013).
91. Janowska-Wieczorek, A., Marquez-Curtis, L. A., Wysoczynski, M. & Ratajczak, M. Z. Enhancing effect of platelet-derived microvesicles on the invasive potential of breast cancer cells. *Transfusion* **46**, 1199–1209 (2006).
92. Diaz, L. A. & Bardelli, A. Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. *J. Clin. Oncol.* **32**, 579–586 (2014).
93. Diehl, F. *et al.* Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat. Med.* **14**, 985–90 (2008).
94. Buder, A., Tomuta, C. & Filipits, M. The potential of liquid biopsies. *Curr. Opin. Oncol.* **28**, 130–134 (2016).
95. Pantel, K. & Alix-Panabières, C. Liquid biopsy: Potential and challenges. *Mol. Oncol.* **10**, 371–373 (2016).
96. Gann, P. H. *et al.* A Prospective Evaluation of Plasma Prostate-Specific Antigen for Detection of Prostatic Cancer. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **273**, 289 (1995).
97. Reiter, W. *et al.* Multivariate analysis of the prognostic value of CEA and CA 19-9 serum levels in colorectal cancer. *Anticancer Res.* **20**, 5195–8 (1999).
98. Molina, R. *et al.* Tumor markers (CEA, CA 125, CYFRA 21-1, SCC and NSE) in patients with non-small cell lung cancer as an aid in histological diagnosis and prognosis. Comparison with the main clinical and pathological prognostic factors. *Tumour Biol.* **24**, 209–18 (2003).
99. I.A., C. Liquid biopsy for cancer patients: Principles and practice. *Pathogenesis* **2**, 1–4 (2015).
100. Qin, Z., Ljubimov, V. A., Zhou, C., Tong, Y. & Liang, J. Cell-free circulating tumor DNA in cancer. *Chin. J. Cancer* **35**, 36 (2016).
101. Cheng, F., Su, L. & Qian, C. Circulating tumor DNA : a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget* (2016).
102. Roth, C. *et al.* Apoptosis-related deregulation of proteolytic activities and high serum levels of circulating nucleosomes and DNA in blood correlate with breast cancer progression. *BMC Cancer* **11**, 4 (2011).
103. Choi, J.-J., Reich, C. F. & Pisetsky, D. S. The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. *Immunology* **115**, 55–62 (2005).
104. Schwarzenbach, H. *et al.* Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **15**, 1032–8 (2009).
105. Schwarzenbach, H., Hoon, D. S. B. & Pantel, K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 426–37 (2011).
106. García-Olmo, D. C. *et al.* Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res.* **70**, 560–7 (2010).
107. Ma, M. *et al.* ‘Liquid biopsy’-ctDNA detection with great potential and challenges. *Ann. Transl. Med.* **3**, 235 (2015).

108. Oxnard, G. R. *et al.* Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA. *Clin. Cancer Res.* **20**, 1698–705 (2014).
109. Murtaza, M. *et al.* Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* **497**, 108–12 (2013).
110. Traver, S. *et al.* Cell-free nucleic acids as non-invasive biomarkers of gynecological cancers, ovarian, endometrial and obstetric disorders and fetal aneuploidy. *Hum. Reprod. Update* **20**, 905–923 (2014).
111. Dobrzycka, B. *et al.* Circulating free DNA, p53 antibody and mutations of KRAS gene in endometrial cancer. *Int. J. cancer* **127**, 612–21 (2010).
112. Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8817–8822 (2003).
113. Diehl, F. *et al.* BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nat. Methods* **3**, 551–9 (2006).
114. Richardson, A. L. & Iglehart, J. D. BEAMing up personalized medicine: mutation detection in blood. *Clin. Cancer Res.* **18**, 3209–11 (2012).
115. Asworth, T. A case of cancer in which cells similar to those in tumors were seen in the blood after death. *Aust Med J* **14**, 146–147 (1869).
116. Zhang, Z., Ramnath, N. & Nagrath, S. Current Status of CTCs as Liquid Biopsy in Lung Cancer and Future Directions. *Front. Oncol.* **5**, 209 (2015).
117. Hamilton, G. Clinical relevance of circulating tumor cells in cancer patients. *Mag. Eur. Med. Oncol.* **8**, 227–230 (2015).
118. Lemech, C. R. *et al.* Enumeration and Molecular Characterisation of Circulating Tumour Cells in Endometrial Cancer. *Oncology* **91**, 48–54 (2016).
119. Giuliano, M. *et al.* Circulating tumor cells as early predictors of metastatic spread in breast cancer patients with limited metastatic dissemination. *Breast Cancer Res.* **16**, 440 (2014).
120. Ilie, M. *et al.* ‘Sentinel’ circulating tumor cells allow early diagnosis of lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* **9**, e111597 (2014).
121. Truini, A. *et al.* Clinical Applications of Circulating Tumor Cells in Lung Cancer Patients by CellSearch System. *Front. Oncol.* **4**, 242 (2014).
122. Muinelo-Romay, L. *et al.* Evaluation of Circulating Tumor Cells and Related Events as Prognostic Factors and Surrogate Biomarkers in Advanced NSCLC Patients Receiving First-Line Systemic Treatment. *Cancers (Basel)*. **6**, 153–165 (2014).
123. Liu, M. C. *et al.* Circulating tumor cells: A useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **27**, 5153–5159 (2009).
124. Maheswaran, S. *et al.* Detection of Mutations in EGFR in Circulating Lung-Cancer Cells. *N. Engl. J. Med.* **359**, 366–377 (2008).
125. Jamal-Hanjani, M., Quezada, S. A., Larkin, J. & Swanton, C. Translational Implications of Tumor Heterogeneity. *Clin. Cancer Res.* **21**, 1258–1266 (2015).

126. Marchetti, A. *et al.* Assessment of EGFR mutations in circulating tumor cell preparations from NSCLC patients by next generation sequencing: Toward a real-time liquid biopsy for treatment. *PLoS One* **9**, (2014).
127. Coumans, F. A. W., Ligthart, S. T., Uhr, J. W. & Terstappen, L. W. M. Challenges in the enumeration and phenotyping of CTC. *Clin. Cancer Res.* **18**, 5711–8 (2012).
128. Joosse, S. A., Gorges, T. M. & Pantel, K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol. Med.* **7**, 1–11 (2015).
129. Alix-Panabières, C. & Pantel, K. Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. *Lab Chip* **14**, 57–62 (2014).
130. Yap, T. A., Lorente, D., Omlin, A., Olmos, D. & de Bono, J. S. Circulating tumor cells: A multifunctional biomarker. *Clin. Cancer Res.* **20**, 2553–2558 (2014).
131. Gabriel, M. T., Calleja, L. R., Chalopin, A., Ory, B. & Heymann, D. Circulating Tumor Cells: A Review of Non-EpCAM-Based Approaches for Cell Enrichment and Isolation. *Clin. Chem.* **581**, (2016).
132. Grover, P. K., Cummins, A. G., Price, T. J., Roberts-Thomson, I. C. & Hardingham, J. E. Circulating tumour cells: The evolving concept and the inadequacy of their enrichment by EpCAM-based methodology for basic and clinical cancer research. *Ann. Oncol.* **25**, 1506–1516 (2014).
133. Müller, C. *et al.* Hematogenous dissemination of glioblastoma multiforme. *Sci. Transl. Med.* **6**, 101 (2014).
134. Chen, X.-X. & Bai, F. Single-cell analyses of circulating tumor cells. *Cancer Biol. Med.* **12**, 184–92 (2015).
135. Hodgkinson, C. L. *et al.* Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. *Nat. Med.* **20**, 897–903 (2014).
136. Yu, M. *et al.* Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science (80-.).* **345**, 216–220 (2014).
137. Zhang, L. *et al.* The identification and characterization of breast cancer CTCs competent for brain metastasis. *Sci. Transl. Med.* **5**, 180ra48 (2013).
138. Cappelletti, V. Molecular Characterization of CTCs: steps towards clinical validity. (2015).
139. Heitzer, E., Auer, M., Ulz, P., Geigl, J. B. & Speicher, M. R. Circulating tumor cells and DNA as liquid biopsies. *Genome Med.* **5**, 73 (2013).
140. Ma, R., Jiang, T. & Kang, X. Circulating microRNAs in cancer: origin, function and application. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **31**, 38 (2012).
141. Place, R. F., Li, L.-C., Pookot, D., Noonan, E. J. & Dahiya, R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 1608–13 (2008).
142. Lee, R. C. & Ambros, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* **294**, 862–4 (2001).
143. Chim, S. S. C. *et al.* Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin. Chem.* **54**, 482–90 (2008).

144. Lawrie, C. H. *et al.* Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* **141**, 672–5 (2008).
145. Arroyo, J. D. *et al.* Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 5003–8 (2011).
146. Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D. & Remaley, A. T. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.* **13**, 423–33 (2011).
147. Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A. & Burwinkel, B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* **39**, 7223–7233 (2011).
148. Larrea, E. *et al.* New Concepts in Cancer Biomarkers: Circulating miRNAs in Liquid Biopsies. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 627 (2016).
149. Dou, H., Wang, Y., Su, G. & Zhao, S. Decreased plasma let-7c and miR-152 as noninvasive biomarker for non-small-cell lung cancer. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 9291–8 (2015).
150. Silva, J. *et al.* Vesicle-related microRNAs in plasma of nonsmall cell lung cancer patients and correlation with survival. *Eur. Respir. J.* **37**, 617–23 (2011).
151. Kumar, M. S. *et al.* Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3903–8 (2008).
152. He, X.-Y. *et al.* The let-7a microRNA protects from growth of lung carcinoma by suppression of k-Ras and c-Myc in nude mice. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **136**, 1023–8 (2010).
153. Liu, X.-G. *et al.* High expression of serum miR-21 and tumor miR-200c associated with poor prognosis in patients with lung cancer. *Med. Oncol.* **29**, 618–26 (2012).
154. Lee, J.-W. *et al.* The expression of the miRNA-200 family in endometrial endometrioid carcinoma. *Gynecol. Oncol.* **120**, 56–62 (2011).
155. Bianchi, F. *et al.* A serum circulating miRNA diagnostic test to identify asymptomatic high-risk individuals with early stage lung cancer. *EMBO Mol. Med.* **3**, 495–503 (2011).
156. Gercel-Taylor, C., Atay, S., Tullis, R. H., Kesimer, M. & Taylor, D. D. Nanoparticle analysis of circulating cell-derived vesicles in ovarian cancer patients. *Anal. Biochem.* **428**, 44–53 (2012).
157. Verma, M., Lam, T. K., Hebert, E. & Divi, R. L. Extracellular vesicles: potential applications in cancer diagnosis, prognosis, and epidemiology. *BMC Clin. Pathol.* **15**, 6 (2015).
158. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G. & Clayton, A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. cell Biol.* 3.22.1–3.22.29 (2006).
159. Jia, S. *et al.* Emerging Technologies in Extracellular Vesicle-Based Molecular Diagnostics. *Expert Rev.* **14**, 307–321 (2014).

160. Tauro, B. J. *et al.* Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods* **56**, 293–304 (2012).
161. Webber, J. & Clayton, A. How pure are your vesicles? *J. Extracell. vesicles* **2**, 1–6 (2013).
162. Lötval, J. *et al.* Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J. Extracell. vesicles* **3**, 26913 (2014).
163. Loob, R. *et al.* Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J. Extracell. vesicles* **4**, 27031 (2015).
164. Böing, A. N. *et al.* Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J. Extracell. vesicles* **3**, (2014).
165. Szallasi, Z. Another surprising role for exosomes? - Improving next generation sequencing based cancer diagnostics in liquid biopsies. *Ann. Oncol.* **27**, 1–9 (2016).
166. Taylor, D. D. & Gerçel-Taylor, C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **110**, 13–21 (2008).
167. Silva, J. *et al.* Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer. *Genes. Chromosomes Cancer* **51**, 409–418 (2012).
168. Huang, X. *et al.* Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics* **14**, 319 (2013).
169. Rabinowits, G., Gerçel-Taylor, C., Day, J. M., Taylor, D. D. & Kloecker, G. H. Exosomal MicroRNA: A Diagnostic Marker for Lung Cancer. *Clin. Lung Cancer* **10**, 42–46 (2009).
170. Joyce, D. P., Kerin, M. J. & Dwyer, R. M. Exosome-encapsulated microRNAs as circulating biomarkers for breast cancer. *Int. J. Cancer* **139**, 1443–1448 (2016).
171. Gan, H. K., Cvrljevic, A. N. & Johns, T. G. The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered. *FEBS J.* **280**, 5350–70 (2013).
172. Skog, J. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1470–1476 (2008).
173. Vlassov, A. V., Magdaleno, S., Setterquist, R. & Conrad, R. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1820**, 940–948 (2012).
174. Barbazán, J. *et al.* Molecular characterization of circulating tumor cells in human metastatic colorectal cancer. *PLoS One* **7**, e40476 (2012).
175. Klebanov, L. & Yakovlev, A. How high is the level of technical noise in microarray data? *Biol. Direct* **2**, 9 (2007).
176. Zahurak, M. *et al.* Pre-processing Agilent microarray data. *BMC Bioinformatics* **8**, 142 (2007).
177. Ritchie, M. E. *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* **43**, e47 (2015).

178. Tibshirani, A. R., Chu, G., Narasimhan, B. & Li, J. Package samr. SAM: Significance Analysis of Microarrays: R package version 2.0. (2011).
179. Tabas-Madrid, D., Nogales-Cadenas, R. & Pascual-Montano, A. GeneCodis3: A non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Res.* **40**, 478–483 (2012).
180. Popat, S. & Houlston, R. S. Re: Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *J.Natl.Cancer Inst.* **97**, 1855–1856 (2005).
181. Yoshioka, Y. *et al.* Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types. *J. Extracell. vesicles* **2**, 1–9 (2013).
182. Ong, S. E. & Mann, M. A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat. Protoc.* **1**, 2650–2660 (2006).
183. Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J.D., Bron, S. & van Dijk, J.M. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol. Biol. Rev.* **64**, 515–47 (2000).
184. Pavlou, M. P. & Diamandis, E. P. The cancer cell secretome: a good source for discovering biomarkers? *J. Proteomics* **73**, 1896–906 (2010).
185. Mustafa, S. A., Hoheisel, J. D. & Alhamdani, M. S. S. Secretome profiling with antibody microarrays. *Mol. Biosyst.* **7**, 1795–801 (2011).
186. Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V & Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* **1**, 2856–2860 (2006).
187. Mateos, J. *et al.* Differential protein profiling of synovial fluid from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients using LC-MALDI TOF/TOF. *J. Proteomics* **75**, 2869–2878 (2012).
188. Pathan, M. *et al.* FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. *Proteomics* **15**, 2597–601 (2015).
189. Monge, M. *et al.* Proteomic approach to ETV5 during endometrial carcinoma invasion reveals a link to oxidative stress. *Carcinogenesis* **30**, 1288–1297 (2009).
190. Huang, F., Wu, G. & Yang, K. Oligometastasis and oligo-recurrence: more than a mirage. *Radiat. Oncol.* **9**, 230 (2014).
191. Kim, A. W. & Detterbeck, F. C. Advances in surgical techniques in non-small cell lung cancer. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **34**, 855–866 (2013).
192. Becker, T. M. *et al.* New frontiers in circulating tumor cell analysis: A reference guide for biomolecular profiling toward translational clinical use. *Int. J. Cancer* **134**, 2523–2533 (2014).
193. Alix-Panabières, C., Pantel, K., Alix-Panabières, C. & Pantel, K. Circulating tumor cells: Liquid biopsy of cancer. *Clin. Chem.* **59**, 110–8 (2013).
194. Han, Y., Su, C. & Liu, Z. Methods for detection of circulating cells in non-small cell lung cancer. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **19**, 896–903 (2014).

195. Pesta, M., Kulda, V., Narsanska, A., Fichtl, J. & Topolcan, O. May CTC technologies promote better cancer management? *EPMA J.* **6**, 1 (2015).
196. Esmaeilsabzali, H., Beischlag, T. V, Cox, M. E., Parameswaran, A. M. & Park, E. J. Detection and isolation of circulating tumor cells: principles and methods. *Biotechnol. Adv.* **31**, 1063–1084 (2013).
197. O’Flaherty, J. D. *et al.* Circulating tumour cells, their role in metastasis and their clinical utility in lung cancer. *Lung Cancer* **76**, 19–25 (2012).
198. Alama, A., Truini, A., Coco, S., Genova, C. & Grossi, F. Prognostic and predictive relevance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *Drug Discov. Today* **19**, 1671–1676 (2014).
199. Hofman, V. *et al.* Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: Comparison of the efficacy of the CellSearch Assay™ and the isolation by size of epithelial tumor cell method. *Int. J. Cancer* **129**, 1651–1660 (2011).
200. Krebs, M. G. *et al.* Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J. Thorac. Oncol.* **7**, 306–315 (2012).
201. Went, P. *et al.* Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. *Br. J. Cancer* **94**, 128–35 (2006).
202. Kim, Y. *et al.* Clinicopathological implications of EpCAM expression in adenocarcinoma of the lung. *Anticancer Res.* **29**, 1817–22 (2009).
203. de Wit, S. *et al.* The detection of EpCAM+ and EpCAM– circulating tumor cells. *Sci. Rep.* **5**, 12270 (2015).
204. Devriese, L. A. *et al.* Circulating tumor cell detection in advanced non-small cell lung cancer patients by multi-marker QPCR analysis. *Lung Cancer* **75**, 242–247 (2012).
205. Zhu, W.-F. *et al.* Prognostic value of EpCAM/MUC1 mRNA-positive cells in non-small cell lung cancer patients. *Tumour Biol.* **35**, 1211–1219 (2014).
206. Winslow, M. M. *et al.* Suppression of lung adenocarcinoma progression by Nkx2-1. *Nature* **473**, 101–104 (2011).
207. Geng, J. *et al.* EZH2 promotes tumor progression via regulating VEGF-A/AKT signaling in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* **359**, 275–287 (2015).
208. Kopan, R. & Ilagan, M. X. G. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* **137**, 216–33 (2009).
209. Zong, D., Ouyang, R., Li, J., Chen, Y. & Chen, P. Notch signaling in lung diseases: focus on Notch1 and Notch3. *Ther. Adv. Respir. Dis.* 1–17 (2016).
210. Yuan, X. *et al.* Meta-analysis reveals the correlation of Notch signaling with non-small cell lung cancer progression and prognosis. *Sci. Rep.* **5**, 10338 (2015).
211. Westhoff, B. *et al.* Alterations of the Notch pathway in lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 22293–22298 (2009).
212. Zolkiewska, A. ADAM proteases: ligand processing and modulation of the Notch pathway. *Cell* **65**, 2056–2068 (2009).

213. Shih, I.-M. & Wang, T.-L. Notch Signaling, γ -Secretase Inhibitors, and Cancer Therapy. *Cancer Res.* **67**, 1879–1882 (2007).
214. Fortini, M. E. Signalling: γ -Secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 673–684 (2002).
215. Wael, H. *et al.* Notch1 signaling controls cell proliferation, apoptosis and differentiation in lung carcinoma. *Lung Cancer* **85**, 131–140 (2014).
216. Licciulli, S. *et al.* Notch1 is required for Kras-induced lung adenocarcinoma and controls tumor cell survival via p53. *Cancer Res.* **73**, 5974–84 (2013).
217. Cao, H. *et al.* Down-regulation of Notch receptor signaling pathway induces caspase-dependent and caspase-independent apoptosis in lung squamous cell carcinoma cells. *Apms* **120**, 441–450 (2012).
218. Ji, X., Wang, Z., Sarkar, F. H. & Gupta, S. V. Delta-tocotrienol augments cisplatin-induced suppression of non-small cell lung cancer cells via inhibition of the Notch-1 pathway. *Anticancer Res.* **32**, 2647–55 (2012).
219. Matsuno, Y., Coelho, A. L., Jarai, G., Westwick, J. & Hogaboam, C. M. Notch signaling mediates TGF- β 1-induced epithelial–mesenchymal transition through the induction of Snail. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 776–789 (2012).
220. Xie, M. *et al.* Activation of notch-1 enhances epithelial-mesenchymal transition in gefitinib-acquired resistant lung cancer cells. *J. Cell. Biochem.* **113**, 1501–1513 (2012).
221. Xie, M., He, C.-S., Wei, S.-H. & Zhang, L. Notch-1 contributes to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor acquired resistance in non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. *Eur. J. Cancer* **49**, 3559–3572 (2013).
222. Li, L. *et al.* DLK1 promotes lung cancer cell invasion through upregulation of MMP9 expression depending on Notch signaling. *PLoS One* **9**, e91509 (2014).
223. Puglisi, F. *et al.* Galectin-3 expression in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Lett.* **212**, 233–239 (2004).
224. Szöke, T. *et al.* The role of microvascularization and growth/adhesion-regulatory lectins in the prognosis of non-small cell lung cancer in stage II. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **31**, 783–7 (2007).
225. O'Driscoll, L. *et al.* Galectin-3 expression alters adhesion, motility and invasion in a lung cell line (DLKP), in vitro. *Anticancer Res.* **22**, 3117–3125 (2002).
226. Ming, J., Liu, N., Gu, Y., Qiu, X. & Wang, E.-H. PRL-3 facilitates angiogenesis and metastasis by increasing ERK phosphorylation and up-regulating the levels and activities of Rho-A/C in lung cancer. *Pathology* **41**, 118–26 (2009).
227. Jian, M. *et al.* Downregulating PRL-3 inhibit migration and invasion of lung cancer cell via RhoA and mDia1. *Tumori* **98**, 370–376 (2012).

228. Lian, Y. X., Chen, R., Xu, Y. H., Peng, C. L. & Hu, H. C. Effect of protein-tyrosine phosphatase 4A3 by small interfering RNA on the proliferation of lung cancer. *Gene* **511**, 169–176 (2012).
229. Symonds, J. M., Ohm, A. M., Tan, A. & Reyland, M. E. PKC δ regulates integrin α V β 3 expression and transformed growth of K-ras dependent lung cancer cells. *Oncotarget* **7**, 17905–17919 (2016).
230. Ni, R., Huang, Y. & Wang, J. miR-98 targets ITGB3 to inhibit proliferation, migration, and invasion of non-small-cell lung cancer. *Onco. Targets. Ther.* **8**, 2689–97 (2015).
231. Zhao, B. *et al.* MicroRNA let-7c inhibits migration and invasion of human non-small cell lung cancer by targeting ITGB3 and MAP4K3. *Cancer Lett.* **342**, 43–51 (2014).
232. Bang, C. & Thum, T. Exosomes: New players in cell–cell communication. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 2060–2064 (2012).
233. Skog, J. *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1470–1476 (2008).
234. Ji, H. *et al.* Proteome profiling of exosomes derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells reveal differential expression of key metastatic factors and signal transduction components. *Proteomics* **13**, 1672–1686 (2013).
235. Zeisberg, M. & Neilson, E. G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest.* **119**, 1429–37 (2009).
236. Thiery, J. P. & Sleeman, J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 131–42 (2006).
237. Deisenroth, C., Thorner, A. R., Enomoto, T., Perou, C. M. & Zhang, Y. Mitochondrial Hep27 is a c-Myb target gene that inhibits Mdm2 and stabilizes p53. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 3981–93 (2010).
238. Pandey, M. K. *et al.* Targeting Cell Survival Proteins for Cancer Cell Death. *Pharmaceuticals* **9**, 11 (2016).
239. Lianos, G. D. *et al.* The role of heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett.* **360**, 114–118 (2015).
240. Le Bras, G. F., Taubenslag, K. J. & Andl, C. D. The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal-transition, motility and tumor progression. *Cell Adh. Migr.* **6**, -1 (2012).
241. Patel, S., Ngounou Wetie, A. G., Darie, C. C. & Clarkson, B. D. Cancer secretomes and their place in supplementing other hallmarks of cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **806**, 409–42 (2014).
242. Park, J. E. *et al.* Hypoxic Tumor Cell Modulates Its Microenvironment to Enhance Angiogenic and Metastatic Potential by Secretion of Proteins and Exosomes. *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 1085–1099 (2010).
243. Runz, S. *et al.* Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and EpCAM. *Gynecol. Oncol.* **107**, 563–571 (2007).
244. Went, P. T. *et al.* Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum. Pathol.* **35**, 122–8 (2004).
245. Rupp, A.-K. *et al.* Loss of EpCAM expression in breast cancer derived serum exosomes: Role of proteolytic cleavage. *Gynecol. Oncol.* **122**, 437–446 (2011).

246. Tauro, B. J. *et al.* Two distinct populations of exosomes are released from LIM1863 colon carcinoma cell-derived organoids. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 587–98 (2013).
247. Coren, L. V, Shatzer, T. & Ott, D. E. CD45 immunoaffinity depletion of vesicles from Jurkat T cells demonstrates that exosomes contain CD45: no evidence for a distinct exosome/HIV-1 budding pathway. *Retrovirology* **5**, 64 (2008).
248. Koga, K. *et al.* Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes. *Anticancer Res.* **25**, 3703–3707 (2005).
249. José-Enériz, E. S. *et al.* BCR-ABL1-induced expression of HSPA8 promotes cell survival in chronic myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **142**, 571–582 (2008).
250. Shan, N., Zhou, W., Zhang, S. & Zhang, Y. Identification of HSPA8 as a candidate biomarker for endometrial carcinoma by using iTRAQ-based proteomic analysis. *Onco. Targets. Ther.* **9**, 2169–79 (2016).
251. Alonso-Alconada, L. *et al.* ETV5 transcription program links BDNF and promotion of EMT at invasive front of endometrial carcinomas. *Carcinogenesis* **35**, 2679–2686 (2014).
252. Mantovani, A. Cancer: Inflaming metastasis. *Nature* **457**, 36–37 (2009).
253. Balkwill, F. & Mantovani, A. Inflammation and cancer: Back to Virchow? *Lancet* **357**, 539–545 (2001).
254. Vestweber, D. Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunol. Rev.* **218**, 178–196 (2007).
255. Nazarenko, I. *et al.* Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Res.* **70**, 1668–1678 (2010).
256. Yoong, K. F., McNab, G., Hübscher, S. G. & Adams, D. H. Vascular adhesion protein-1 and ICAM-1 support the adhesion of tumor-infiltrating lymphocytes to tumor endothelium in human hepatocellular carcinoma. *J. Immunol.* **160**, 3978–88 (1998).
257. Hiratsuka, S. *et al.* Endothelial focal adhesion kinase mediates cancer cell homing to discrete regions of the lungs via E-selectin up-regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 3725–30 (2011).
258. Wight, T., Kang, I. & Merrilees, M. Versican and the control of inflammation. *Matrix Biol.* **35**, 152–161 (2014).
259. Graaff, V. de. *Human Anatomy. IV. Maintenance of the body. Respiratory System.* (Mc Graw-Hill, 2001).
260. Alavanja, M. *et al.* Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks to Humans* **83**, 1–1413 (2004).
261. Dasgupta, P. *et al.* Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines. *Int. J. Cancer* **124**, 36–45 (2009).
262. El Ghissassi, F. *et al.* A review of human carcinogens—Part D: radiation. *Lancet Oncol.* **10**, 751–752 (2009).
263. Omenn, G. S., Merchant, J. & Boatman, E. Contribution of environmental fibers to respiratory cancer. *Environ. Health Perspect.* **Vol. 70**, 51–56 (1986).

264. Slatore, C. G., Chien, J. W., Au, D. H., Satia, J. A. & White, E. Lung cancer and hormone replacement therapy: association in the vitamins and lifestyle study. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1540–6 (2010).
265. Pelucchi, C., Bosetti, C., Galeone, C. & La Vecchia, C. Dietary acrylamide and cancer risk: An updated meta-analysis. *Int. J. Cancer* **136**, 2912–2922 (2015).
266. Arenberg, D. Lung cancer screening. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **34**, 727–737 (2013).
267. National Lung Screening Trial Research Team *et al.* Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N. Engl. J. Med.* **365**, 395–409 (2011).
268. Polanski, J., Jankowska-Polanska, B., Rosinczuk, J., Chabowski, M. & Szymanska-Chabowska, A. Quality of life of patients with lung cancer. *Oncotargets. Ther.* **9**, 1023–1028 (2016).
269. Heigener, D. F., Diemel, K. D., Reck, M. & Gatzemeier, U. Diagnostics and staging procedures in non-small cell lung cancer - is less more? *Clin. Respir. J.* **2**, 67–73 (2008).
270. Reck, M., Heigener, D. F., Mok, T., Soria, J.-C. & Rabe, K. F. Management of non-small-cell lung cancer: recent developments. *Lancet* **382**, 709–19 (2013).
271. Travis, W. D. *et al.* International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma: executive summary. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **8**, 381–385 (2011).
272. Travis W.D. *et al.* World Health Organization classification of tumours; tumours of lung, pleura, thymus and heart. *Int. Agency Res. Cancer* **50**, 9–122 (2004).
273. Beasley, M. B., Brambilla, E. & Travis, W. D. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin. Roentgenol.* **40**, 90–97 (2005).
274. Goldstraw, P. New TNM classification: achievements and hurdles. *Transl. lung cancer Res.* **2**, 264–72 (2013).
275. Oken, M. M. *et al.* Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am. J. Clin. Oncol.* **5**, 649–55 (1982).
276. Shames, D. S. & Wistuba, I. I. The evolving genomic classification of lung cancer. *J. Pathol.* **232**, 121–133 (2014).
277. Fujimoto, J. & Wistuba, I. I. Current concepts on the molecular pathology of non-small cell lung carcinoma. *Semin. Diagn. Pathol.* **31**, 306–313 (2014).
278. Pao, W. & Girard, N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.* **12**, 175–180 (2011).
279. Soda, M. *et al.* A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 19893–7 (2008).
280. Kohno, T. *et al.* Beyond ALK-RET, ROS1 and other oncogene fusions in lung cancer. *Transl. lung cancer Res.* **4**, 156–64 (2015).
281. Semenova, E. A., Nagel, R. & Berns, A. Origins, genetic landscape, and emerging therapies of small cell lung cancer. *Genes Dev.* **29**, 1447–1462 (2015).

282. George, J. *et al.* Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature* **524**, 47–53 (2015).
283. Scott, W. J., Howington, J., Feigenberg, S., Movsas, B. & Pisters, K. Treatment of non-small cell lung cancer stage I and stage II: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* **132**, 234–242 (2007).
284. Arriagada, R. *et al.* Long-term results of the international adjuvant lung cancer trial evaluating adjuvant cisplatin-based chemotherapy in resected lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 35–42 (2010).
285. Scagliotti, G. V. *et al.* Randomized phase III study of surgery alone or surgery plus preoperative cisplatin and gemcitabine in stages IB to IIIA non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **30**, 172–178 (2012).
286. Liao, Z. X. *et al.* Influence of Technologic Advances on Outcomes in Patients With Unresectable, Locally Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Receiving Concomitant Chemoradiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **76**, 775–781 (2010).
287. Kumar, M., Ernani, V. & Owonikoko, T. K. Biomarkers and targeted systemic therapies in advanced non-small cell lung cancer. *Mol. Aspects Med.* **45**, 55–66 (2015).
288. Toyokawa, G. & Seto, T. ALK inhibitors: What is the best way to treat patients with ALK+ non-small-cell lung cancer? *Clin. Lung Cancer* **15**, 313–319 (2014).
289. Solomon, B. J. *et al.* First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK-Positive Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2167–2177 (2014).
290. Kim, H. R. *et al.* Distinct clinical features and outcomes in never-smokers with nonsmall cell lung cancer who harbor EGFR or KRAS mutations or ALK rearrangement. *Cancer* **118**, 729–739 (2012).
291. Khozin, S. *et al.* FDA Approval: Ceritinib for the Treatment of Metastatic Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* **21**, 2436–9 (2015).
292. Song, Z., Wang, M. & Zhang, A. Alectinib: a novel second generation anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor for overcoming clinically-acquired resistance. *Acta Pharm. Sin. B* **5**, 34–37 (2015).
293. Huang, L. & Fu, L. Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Acta Pharm. Sin. B* **5**, 390–401 (2015).
294. Cohen, M. H. *et al.* Approval Summary: Erlotinib Maintenance Therapy of Advanced/Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Oncologist* **15**, 1344–1351 (2010).
295. Cohen, M. H., Johnson, J. R., Chen, Y.-F., Sridhara, R. & Pazdur, R. FDA Drug Approval Summary: Erlotinib (Tarceva(R)) Tablets. *Oncologist* **10**, 461–466 (2005).
296. Cohen, M. H., Williams, G. A., Sridhara, R., Chen, G. & Pazdur, R. FDA Drug Approval Summary: Gefitinib (ZD1839) (Iressa(R)) Tablets. *Oncologist* **8**, 303–306 (2003).
297. Al-Sanea, M. M. *et al.* ROS1 Kinase Inhibitors for Molecular-Targeted Therapies. *Curr. Med. Chem.* **23**, 142–60 (2016).

298. Rothschild, S. I. Targeted therapies in non-small cell lung cancer-Beyond EGFR and ALK. *Cancers (Basel)*. **7**, 930–949 (2015).
299. Ohyanagi, F. *et al.* Phase II study of docetaxel-plus-bevacizumab combination therapy in patients previously treated for advanced non-squamous non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* **34**, 5153–5158 (2014).
300. D., P. *et al.* Interim results of phase II study BRF113928 of dabrafenib in BRAF V600E mutation-positive non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *J. Clin. Oncol.* **31**, 8009 (2013).
301. Bobbio, A. & Alifano, M. Immune therapy of non-small cell lung cancer. The future. *Pharmacol. Res.* **99**, 217–222 (2015).
302. Rizvi, N. A. *et al.* Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer: A phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol.* **16**, 257–265 (2015).
303. Brundage, M. D., Davies, D. & Mackillop, W. J. Prognostic factors in non-small cell lung cancer: A decade of progress. *Chest* **122**, 1037–1057 (2002).
304. Argiris, A. & Murren, J. R. Staging and clinical prognostic factors for small-cell lung cancer. *Cancer J.* **7**, 437–447 (2001).
305. Mallett, S., Timmer, A., Sauerbrei, W. & Altman, D. G. Reporting of prognostic studies of tumour markers: a review of published articles in relation to REMARK guidelines. *Br. J. Cancer* **102**, 173–80 (2010).
306. Simon, C., Horcajadas, J., Garcia Velasco, J. & Pellicer, A. *El endometrio humano. Desde la investigación a la clínica*. Editotial Paramericana (2009).
307. Cabero, L. *Tratado de Ginecología, obstetricia y medicina de la reproducción*. (E.M. Panamericana, 2003).
308. Liang, J. & Shang, Y. Estrogen and Cancer. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 225–240 (2013).
309. Aune, D. *et al.* Anthropometric factors and endometrial cancer risk: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Ann. Oncol.* **26**, 1635–1648 (2015).
310. Szablewski, L. Diabetes mellitus: influences on cancer risk. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **30**, 543–53 (2014).
311. Carlson, M. J., Thiel, K. W., Yang, S. & Leslie, K. K. Catch it before it kills: progesterone, obesity, and the prevention of endometrial cancer. *Discov. Med.* **14**, 215–22 (2012).
312. Ponce i Sebastia, J., Torrejon, R. & M, B. *Oncoguia SEGO: Cáncer de endometrio. Guías de práctica clínica en cáncer ginecológico y mamario*. (SEOM, 2010).
313. Jones, M. E. *et al.* Endometrial cancer survival after breast cancer in relation to tamoxifen treatment: pooled results from three countries. *Breast Cancer Res.* **14**, R91 (2012).
314. Tiwari, A. K., Roy, H. K. & Lynch, H. T. Lynch syndrome in the 21st century: clinical perspectives. *QJM An Int. J. Med.* **109**, 151–158 (2016).

315. Anderson, G. L. *et al.* Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Combined Estrogen – Progestogen Contraceptives and Combined Estrogen – Progestogen Menopausal Therapy Combined Estrogen – Progestogen Contraceptives and Combined Estrogen –. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks to Humans* **91**, 1–543 (2007).
316. Perez-Sanchez, C. *et al.* Molecular diagnosis of endometrial cancer from uterine aspirates. *Int. J. Cancer* **133**, 2383–2391 (2013).
317. Colas, E. *et al.* Molecular markers of endometrial carcinoma detected in uterine aspirates. *Int. J. cancer* **129**, 2435–44 (2011).
318. Robbins, S. & Cotran, R. *Robbins, Patología Humana 8th ed. Elsevier España.* (2003).
319. Sivridis, E. & Giatromanolaki, A. The endometrial hyperplasias revisited. *Virchows Arch.* **453**, 223–231 (2008).
320. Ben-Arie, A. *et al.* The malignant potential of endometrial polyps. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **115**, 206–210 (2004).
321. Bokhman, J. V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* **15**, 10–7 (1983).
322. Kurman, R. J., Visvanathan, K. & Shih, I. M. Bokhman’s dualistic model of endometrial carcinoma. Revisited. *Gynecol. Oncol.* **129**, 271–272 (2013).
323. Murali, R., Soslow, R. A. & Weigelt, B. Classification of endometrial carcinoma: More than two types. *Lancet Oncol.* **15**, 268–278 (2014).
324. Pecorelli S. FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* **105**, 103–104 (2009).
325. Doll, A. *et al.* Novel molecular profiles of endometrial cancer-new light through old windows. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **108**, 221–229 (2008).
326. Lee, P. S. & Secord, A. A. Targeting molecular pathways in endometrial cancer: A focus on the FGFR pathway. *Cancer Treat. Rev.* **40**, 507–512 (2014).
327. Pavlidou, A. & Vlahos, N. F. Molecular alterations of PI3K/Akt/mTOR pathway: A therapeutic target in endometrial cancer. *Sci. World J.* **2014**, (2014).
328. Albitar, L. *et al.* EGFR isoforms and gene regulation in human endometrial cancer cells. *Mol. Cancer* **9**, 166 (2010).
329. Liu, F. S. Molecular carcinogenesis of endometrial cancer. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* **46**, 26–32 (2007).
330. Yarden, Y. & Sliwkowski, M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 127–37 (2001).
331. Lapiska-Szumczyk, S. *et al.* HER2-Positive Endometrial Cancer Subtype Carries Poor Prognosis. *Clin. Transl. Sci.* **7**, 482–488 (2014).
332. Zheng, X., Du, X.-L. & Jiang, T. Prognostic significance of reduced immunohistochemical expression of E-cadherin in endometrial cancer-results of a meta-analysis. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 18689–96 (2015).

333. Shao, R. Progesterone receptor isoforms A and B: New insights into the mechanism of progesterone resistance for the treatment of endometrial carcinoma. *Ecancermedicalscience* **7**, 1–8 (2013).
334. Dobrzycka, B. & Terlikowski, S. J. Biomarkers as prognostic factors in endometrial cancer. *Folia Histochem. Cytobiol.* **48**, 319–322 (2010).







LISTA DE FIGURAS

Figura 1 (p22). Tasa de supervivencia a 5 años para cáncer de pulmón y cáncer de útero en función del grado de diseminación tumoral .

Figura 2 (p26). La cascada de diseminación metastásica

Figura 3 (p30). Principales rutas de señalización vinculadas al programa de EMT

Figura 4 (p32). La sobreexpresión de ETV5 en HEC-1A desencadena un proceso de EMT

Figura 5 (p34). El microambiente tumoral participa en la diseminación y colonización metastásica

Figura 6 (p36). Origen de las vesículas extracelulares y su distribución

Figura 7 (p45). Tecnologías de enriquecimiento de CTCs

Figura 8 (p71). Flujo de trabajo para el aislamiento de exosomas a partir de medios condicionados

Figura 9 (p94). La sangre procedente de pacientes de NSCLC contiene CTCs

Figura 10 (p94). Área bajo la curva de *GAPDH* y *PTPRC* para progresión temprana en pacientes de NSCLC avanzado

Figura 11 (p95). Flujo de trabajo utilizado para la caracterización del perfil de expresión de CTCs en NSCLC avanzado

Figura 12 (p96). Análisis de Componentes Principales para las muestras incluidas en el *microarray*

Figura 13 (p97) . Red de interacción para las funciones de movimiento, desarrollo, crecimiento y proliferación celulares contenidas en el *microarray* de expresión de NSCLC

Figura 14 (p98). Expresión de *NOTCH1* y *HES1* en CTCs de NSCLC.

Figura 15 (p99). Validación del perfil de expresión génica de CTCs Ep-CAM⁺ en NSCLC y la función de la ruta de *NOTCH1*

Figura 16 (p100). Inhibición de Notch en A549

Figura 17 (p102). Curvas Kaplan-Meier para los marcadores de CTCs validados en NSCLC para Supervivencia Libre de Progresión

Figura 18 (p103). Modelo de regresión logística para los marcadores de CTCs en NSCLC

Figura 19 (p104). Curvas Kaplan-Meier para PFS y OS y la acumulación de biomarcadores de CTCs incluidos en el modelo de regresión logística

Figura 20 (p106). Caracterización de purificados de exosomas

Figura 21 (p107). Caracterización de exosomas de líquido ascítico y rec-ta patrón de exosomas en *ZetaSizer*

Figura 22 (p108). Distribución de tamaño de los aislados de exosomas de HEC-1A, H-ETV5 y los distintos medios de cultivo y vehículos utilizados

Figura 23 (p108). Estabilidad de los purificados de exosomas

Figura 24 (p109). La sobreexpresión de ETV5 promueve EMT en HEC-1A

Figura 25 (p108). Rendimiento de exosomas para las líneas HEC-1A y H-ETV5

Figura 26 (p111). Flujo de trabajo utilizado para la caracterización proteica del proteoma, secretoma y exosoma de HEC-1A y H-ETV5

Figura 27 (p11). Características fenotípicas HEC-1A y H-ETV5 durante el marcaje SILAC

Figura 28 (p112). Proliferación de HEC-1A y H-ETV5 a concentraciones decrecientes de L-Arginina y L-Lisina

Figura 29 (p113). Marcaje para SILAC

Figura 30 (p114). Geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata para las distintas fracciones de proteoma, secretoma soluble y exosoma

Figura 31 (p115). Perfil proteómico del secretoma de HEC-1A y H-ETV5 por SILAC

Figura 32 (p116). Proteínas moduladas positivamente en el secretoma

Figura 33 (p120). Efecto del exosoma en la adhesión de las células tumorales de CE.

Figura 34 (p121). Adhesión de HEC-1A y H-ETV5 a componentes de la matriz

Figura 35 (p122). Adhesión de H-ETV5 a células endoteliales

Figura 36 (p122). Activación de células endoteliales HUVEC por el tratamiento con exosomas

Figura 37 (p136). La vía de señalización de Notch e inhibidores de la ruta

Figura 38 (p146). El exosoma tumoral en el anidamiento de la Célula Tumoral Diseminada

Figura 39 (p155). Anatomía del sistema respiratorio humano

Figura 40 (p158). Evolución en el tiempo de la clasificación histológica del cáncer de pulmón

Figura 41 (p160). Principales subtipos histológicos en cáncer de pulmón

Figura 42 (p164). Evolución de clasificación genómica de NSCLC y alteraciones genéticas más frecuentes por tipo histológico

Figura 43 (p171). Factores pronóstico más representativos en NSCLC

Figura 44 (p173). Anatomía del útero humano

Figura 45 (p180). Principales subtipos histológicos del cáncer de endometrio

Figura 46 (p181). Modelo dualístico de progresión del carcinoma endometrial

Figura S1 (p123). Curvas Kaplan-Meier para los marcadores de CTCs validados en NSCLC para Supervivencia Global

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 (p34). Características del microambiente tumoral

Tabla 2 (p41). Ventajas de la biopsia líquida como herramienta clínica

Tabla 3 (p47). Características de las CTCs y el ctDNA de interés clínico

Tabla 4 (p62). Características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio

Tabla 5 (p62). Características clínico-patológicas de los pacientes empleados en el *microarray* de expresión génica

Tabla 6 (p75). Muestras generadas para su análisis por SILAC

Tabla 7 (p89). Sondas *Taqman*® empleadas en el estudio

Tabla 8 (p89). Anticuerpos utilizados para *Western blot*

Tabla 9 (p97). Funciones significativamente representadas en el perfil de expresión de CTCs para NSCLC avanzado

Tabla 10 (p98). Funciones destacadas en el perfil de expresión de CTCs por *GeneCodis3*

Tabla 11 (p101). Análisis de Cox univariante para los marcadores de CTCs y parámetros clínico-patológicos

Tabla 12 (p103). Análisis de Cox multivariante para los marcadores de CTCs y presencia de metástasis óseas

Tabla 13 (p104). Análisis de Cox multivariante para la acumulación de marcadores de CTCs y presencia de metástasis óseas

Tabla 14 (p118). Proteínas identificadas en ambas preparaciones de exosomas y ausentes en el secretoma

Tabla 15 (p119). Funciones vinculadas a la red de *Tissue & Cell morphology* por IPA

Tabla 16 (p162). Clasificación TNM del cáncer de pulmón

Tabla 17 (p163). Clasificación del Estado Funcional del paciente

Tabla 18 (p167). Principales compuestos quimioterápicos en el tratamiento del CP

Tabla 19 (p179). Clasificación dualística del CE en función de sus características clínico-patológicas

Tabla 20 (p180). Estadificación FIGO para el carcinoma endometrial

Tabla 21 (p181). Clasificación del carcinoma endometrial en función del grado histológico

Tabla 22 (p183). Alteraciones genéticas más frecuentes en CE en función del tipo histológico

Tabla S1 (p124). Proteínas significativamente moduladas para el proteoma de HEC-1A / H-ETV5 por SILAC. Proteínas más expresadas en el proteoma de H-ETV5 respecto a HEC-1A

Tabla S2 (p125). Proteínas significativamente moduladas para el proteoma de HEC-1A / H-ETV5 por SILAC. Proteínas más expresadas en el proteoma de HEC-1A respecto a H-ETV5

Tabla S3 (p126). Proteínas significativamente moduladas para el secretoma de HEC-1A / H-ETV5 por SILAC. Proteínas más expresadas en el secretoma de H-ETV5 respecto a HEC-1A

Tabla S4 (p127-128). Proteínas significativamente moduladas para el secretoma de HEC-1A / H-ETV5 por SILAC. Proteínas más expresadas en el secretoma de HEC-1A respecto a H-ETV5

Tabla S5 (p128). Proteínas significativamente moduladas para el exosoma de HEC-1A / H-ETV5 por SILAC. Proteínas más expresadas en el exosoma de H-ETV5 respecto a HEC-1A

Tabla S6 (p129). Proteínas significativamente moduladas para el exosoma de HEC-1A / H-ETV5 por SILAC. Proteínas más expresadas en el exosoma de HEC-1A respecto a H-ETV5

Tablas incluidas en el CD adjunto al ejemplar de tesis:

Tabla S7. Genes estadísticamente más detectados en CTCs de pacientes de NSCLC avanzado que en controles

Tabla S8. Sondas detectadas únicamente en pacientes de NSCLC avanzado en *Gene Expression microarray*

Tabla S9. Proteínas identificadas en el proteoma de HEC-1A / H-ETV5 por SILAC

Tabla S10. Proteínas identificadas en el secretoma de HEC-1A / H-ETV5 por SILAC

Tabla S11. Proteínas identificadas en el exosoma de HEC-1A / H-ETV5 por SILAC







LISTA DE ABREVIATURAS

3D-CRT: Radioterapia Conformada Tridimensional

ACN: Acetonitrilo

ADAM: Familia de metaloproteinasas ADAM

AKT: *V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1 (P31749)*

ALDH1: *Aldehyde Dehydrogenase 1 Family, Member A1 (P00352)*

ALIX: ver PCDC6IP

ALK: *Anaplastic Lymphoma Receptor Tyrosine Kinase (Q9UM73)*

Arg: Arginina

ATS: *American Thoracic Society*

AUROC: Área bajo la curva

BCA: Ácido bicinchonínico

BCL2: *B-Cell CLL/Lymphoma 2 (P10415)*

BEAMing: *Beads, Emulsification, Amplification & Magnetics*

BMDC: *Bone Marrow Derived Cell*

BRAF: *B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase (P15056)*

BSA: Albúmina de suero bovino

CD44: *CD44 Molecule (Indian Blood Group) (P16070)*

CD63: *CD63 Molecule (P08962)*

CD81: *CD81 Molecule (P60033)*

CD9: *CD9 Molecule (P21926)*

cdNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

CE: Cáncer de endometrio

cfDNA: *Circulating cell-free DNA*

CP: Cáncer de pulmón

CSC: Célula madre tumoral

CTC: Célula Tumoral Circulante

CTD: Célula Tumoral Diseminada

ctDNA: *Circulating tumor DNA*

CTNNB1: *Catenin (Cadherin-Associated Protein), Beta 1 (P35222)*

CXCR4: *Chemokine (C-X-C Motif) Receptor 4 (P16073)*

DAPT: *N-[N-(3,5-Difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina t-butil éster*

DDR2: *Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinase 2 (Q16832)*

DHRS2: *Dehydrogenase/Reductase (SDR Family) Member 2 (Q13268)*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxirribonucleótido trifosfato

DOC: Deoxicolato

DTT: Ditioneitol

EBM2: *Endothelial Basal Medium 2*

ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EEC: Carcinoma de endometrio endometriode

EGF: *Epidermal Growth Factor (P01133)*

EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor (P00533)*

EGM2: *Endothelial Growth Medium 2*

EML4: *Echinoderm Microtubule Associated Protein Like 4 (Q9HC35)*

EMT: Transición Epitelio-Mesénquima

EpCAM: *Epithelial Cell Adhesion Molecule (P16422)*

ER: Receptor de estrógenos

ERBB2: *Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2 (P04626)*

ERS: *European Respiratory Society*

ESCRT: *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*

ESR2: *Estrogen Receptor 2 (ER Beta) (Q92731)*

ETS: *E-26 transformacion specific*

ETV5: *Ets variant 5 (P41161)*

FBS: Suero fetal bovino

FBS Exo-16h: Suero fetal bovino deplecionado de exosomas

FDA: *Food & Drug Administration*

FDR: Tasa de falso descubrimiento

FGF: *Fibroblast Growth Factor*

FGFR1: *Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (P11362)*

GAPDH: *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (P04406)*

GDF15: *Growth Differentiation Factor 15 (Q99988)*

GEM: Gemcitabina

GRP94: ver HSP90B1

H₂O_d: Agua destilada

HER2: ver ERBB2

HES1: *Hes Family BHLH Transcription Factor 1 (P14469)*

HIF1A: *Hypoxia Inducible Factor 1, Alpha Subunit (Q16665)*

HPC: Célula hematopoiética progenitora

HPLC: *High-performance liquid chromatography*

HRP: *Horseradish Peroxidase*

HRT: Terapia de reemplazamiento hormonal

HSP90B1: *Heat Shock Protein 90kDa Beta (Grp94), Member 1 (P14625)*

HSPA8: *Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 8 (P11142)*

HUVEC: Células endoteliales humanas de vena umbilical

IAA: Iodoacetamida

IASLC: *International Association for the Study of Lung Cancer*

ICAM1: *Intercellular Adhesion Molecule 1 (P05362)*

IGRT: Radioterapia guiada por imagen

IL11: *Interleukin 11 (P20809)*

IPA: *Ingeniuty Pathway Analysis*

ISEV: *International Society for Extracellular Vesicles*

ITGB3: *Integrin, Beta 3 (Platelet Glycoprotein IIIa, Antigen CD61) (P05106)*

KRAS: *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog (P01116)*

LDCT: Tomografía de baja dosis

LGALS3: *Lectin, Galactoside-Binding, Soluble, 3 (P17931)*

LLP: *Lipoma preferred partner protein*

LMP: Bajo punto de fusión

Lys: Lisina

M&M: Materiales y Métodos

MDSC: Célula supresora mieloide

MEC: Matriz extracelular

MET: *MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase (P08581)*

MET*: Transición mesénquima-epitelio

MHC: *Major Histocompatibility Complex*

miRNA: MicroRNA

MMP: Metallo-proteinasa de matriz

MMR: *Mismatch repair*

MRI: Imagen por resonancia magnética	PET: Tomografía por emisión de positrones
MRM: <i>Multiple Reaction Monitoring</i>	PFA: Ácido paraformaldehído
mRNA: Ácido ribonucleico mensajero	PFS: Supervivencia libre de progresión
MS: Espectrometría de masas	PIC: Cóctel de inhibidores de proteasas
MSC: Célula madre mesenquimal	PIK3CA: <i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase (P42336)</i>
MUC4: <i>Mucin 4, Cell Surface Associated (Q99102)</i>	PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
MVB: Cuerpo mutivesicular	PR: Receptor de progesterona
MYC: <i>V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog (P01106)</i>	PS: <i>Performance Status</i>
NaTio: Tiosulfato sódico	PTEN: <i>Phosphatase And Tensin Homolog (P60484)</i>
NEEC: Carcinoma de endometrio no-endometriode	PTP4A3: <i>Protein Tyrosine Phosphatase Type IVA, Member 3 (O75365)</i>
NK: <i>Natural Killer</i>	PTPRC: <i>Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, C (P8575)</i>
nm: nanometro	RB1: <i>Retinoblastoma 1 (P06400)</i>
NNK: 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona	RET: <i>Ret Proto-Oncogene (P07949)</i>
NNN: N-nitrososornicotina	RFA: Radiofrecuencia ablativa
NOTCH1: <i>Notch 1 (P46531)</i>	RNA: Ácido ribonucleico
NSCLC: <i>Non-Small Cell Lung Cancer</i>	ROS: Especies reactivas del oxígeno
nt: nucleótido	ROS1: <i>ROS Proto-Oncogene 1 , Receptor Tyrosine Kinase (P08922)</i>
OS: Supervivencia global	RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
PAGE: Electrof. en gel de poliacrilamida	SAM: Análisis de significación para microarrays
PAH: Hidrocarburo aromático cíclico	SCC: Carcinoma de células escamosas
PBS: Tampón fosfato salino	SCLC: <i>Small-cell lung cancer</i>
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa	SDS: Dodecil sulfato
PD: <i>Programmed Cell Death 1 (Q15116)</i>	SELE: <i>Selectin E (P16581)</i>
PDCD6IP: <i>Programmed Cell Death 6 Interacting Protein (Q8WUM4)</i>	SELP: <i>Selectin P (P16109)</i>
PDL-1: <i>Programmed Cell Death 1 Ligand 1 (Q9NZQ7)</i>	SIGP: Sociedad Internacional de Ginecología Patológica
PEA3: <i>Polyomavirus Enhancer Activator3</i>	SILAC: <i>Stable Isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
PenStrep: Penicilina / Estreptomicina	

SNAI1: *Snail Family Zinc Finger 1*
(O95863)

TA: Temperatura ambiente

TAC: Tomografías axial computerizada

TAF: Fibroblasto asociado a tumor

TAM: Macrófago asociado a tumor

TBS: Tampón Tris salino

TE: Solución Tris-EDTA

TEM: Transición mesénquima-epitelio

TEM*: Microscopía electrónica de transmisión

TFA: Ácido tricloroacético

TGFβ1: *Transforming Growth Factor, Beta 1* (P01137)

TK(I): Tirosina kinasa (Inhibidor)

TM4SF: Superfamilia transmembrana 4

TNFα: *Tumor Necrosis Factor α*
(P01375)

TNR: *Tenascin R* (Q92752)

TOF: Tiempo de vuelo

TP53: *Tumor Protein P53* (P04637)

VCAM1: *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* (P19320)

VEGFR: *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor* (P17948)

VNB: Vinorelbine

WTA: Amplificación de transcriptoma completo

ZEB1: *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1* (P37275)

ZEB2: *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2* (O60315)





AGRADECIMIENTOS

Agradecer a los directores de tesis, Miguel, Rafa y María José, la oportunidad de continuar con mi formación, la confianza depositada y la dirección recibida. Estos han sido unos años de profundo aprendizaje.

A mis compañeros de laboratorio. Una puerta abierta. A Laura y Marta por su trabajo en pulmón aún remozado tras remozado. A Lorena y Jorge por sus enseñanzas. A Alex por su ayuda con las exo-cosas. A Ali por su trabajo con las muestras y por sus incursiones vampíricas a la caza de voluntarios. A Cloti, Carmen y resto de compañeros por su disposición y ayuda cuando necesario.

Al resto de compañeros del IDIS

Al servicio de Oncología del CHUS por su compromiso y colaboración. Destacar quizás a María Vieito, cuyo compromiso va más allá de lo excepcional.

A Antonio y Ma Ángeles, del departamento de matemáticas de la USC, por su labor y paciencia. Yo no habría aguantado tanto.

A Valentina y Patricia, del servicio de proteómica del INIBIC, por su disposición y buenhacer.

A pacientes y voluntarios por su disposición y colaboración desinteresada. Una participación ciega pero necesaria.

A mis amigos, a los de aquí y a los de allí, que aguantan mis semanas de ausencia con buena cara, o por lo menos sin echármelo en cara.

A mi familia